



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Tesis doctoral

**TRATAMIENTO CON CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMALES ALOGÉNICAS EN EL
INFARTO CEREBRAL. OPCIONES DE LA
ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA Y FUENTE
DE TEJIDO ADIPOSO**

BERTA RODRÍGUEZ FRUTOS

Madrid 2013



TRATAMIENTO CON CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES ALOGÉNICAS EN EL INFARTO CEREBRAL. OPCIONES DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA Y FUENTE DE TEJIDO ADIPOSEO

Tesis Doctoral presentada por la licenciada

BERTA RODRÍGUEZ FRUTOS

para optar al grado de **DOCTOR**

Directores:

Dra. MARÍA GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ

Coordinadora del Laboratorio de Neurociencia y Cerebrovascular
Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ

Prof. EXUPERIO DÍEZ TEJEDOR

Catedrático del Departamento de Medicina, UAM
Servicio de Neurología del Hospital Universitario La Paz

Madrid, 2013



María Gutiérrez Fernández, Licenciada en Biología, Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid y Coordinadora del Laboratorio de Neurociencia y Cerebrovascular del Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ y **Prof. Exuperio Díez Tejedor**, Catedrático de Neurología, Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Servicio de Neurología del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado **“TRATAMIENTO CON CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES ALOGÉNICAS EN EL INFARTO CEREBRAL. OPCIONES DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA Y FUENTE DE TEJIDO ADIPOSO”** ha sido realizado por Dña. Berta Rodríguez Frutos bajo su dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis para alcanzar el grado de Doctor ante el Tribunal correspondiente en la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid,

Fdo:

Fdo:

Dra. María Gutiérrez Fernández

Prof. Exuperio Díez Tejedor

Este trabajo ha sido financiado con subvenciones concedidas por el Instituto de Salud Carlos III (Proyecto PI06/0575, PS09/01606 y RETICS-RD07/0026/2003 (Red Temática de Investigación Neurovascular Española, RENEVAS))

INDICE

Resumen.....	1
Introducción	9
1. Enfermedad cerebrovascular.....	11
1.1. Carga epidemiológica de la enfermedad	11
2. Patogenia de la isquemia cerebral focal	12
3. Plasticidad, protección y reparación en infarto cerebral	17
4. La terapia celular en el infarto cerebral	18
5. Modelos animales de infarto cerebral.....	19
5.1.Terapia celular en el infarto cerebral en modelos animales.....	20
6.Traslación clínica de la terapia celular en el infarto cerebral	24
Hipótesis y Objetivos.....	27
Material y Métodos.....	31
1. Equipos y materiales utilizados	33
2. Diseño del estudio	35
3. Aislamiento y caracterización de CTM.....	36
3.1. Aislamiento de CTM-MO	36
3.2. Aislamiento de CTM-TA.....	37
3.3.Caracterización de CTM	38
4. Sujetos a estudio.....	38
4.1. Inducción de anestesia y analgesia para procedimiento quirúrgico.....	41
4.2. Monitorización de parámetros fisiológicos.....	41
4.3. Descripción del sistema carotídeo de la rata	42
4.4. Administración de CTM.....	43
4.5. Sacrificio del animal	43
4.6. Procesado para estudio histológico	44
5. Variables de estudio	44
5.1. Escalas de evaluación funcional	45
5.2. Evaluación de la implantación de CTM analizado por RM e inmunofluorescencia ..	46
5.3. Tamaño de lesión analizado por RM.....	46
5.4. Tamaño de lesión analizado por H&E	47
5.5. Inmunohistoquímica.....	48
5.5.1. Muerte celular	48

5.5.2. Proliferación celular	49
5.6. Determinación de citocinas pro-inflamatorias: TNF-alpha e IL-6	50
5.7. Inmunofluorescencia	51
5.8. Análisis de proteínas de tejido cerebral	52
5.8.1. Cuantificación de proteínas.....	52
5.8.2. Western Blot	52
6. Análisis estadístico.....	53
Resultados	55
1. Caracterización de las CTM.....	57
2. Parámetros fisiológicos.....	58
3. Variables de estudio entre las diferentes rutas de administración hemática de las CTM-MO	60
3.1. Evaluación funcional	60
3.2. Implantación de las CTM-MO identificadas por RM e inmunofluorescencia	61
3.3. Tamaño de lesión analizado por RM y H&E	63
3.4. Inmunohistoquímica	65
3.4.1. Muerte celular	65
3.4.2. Proliferación celular	66
3.5. Determinación de citocinas pro-inflamatorias: TNF –alpha e IL-6	67
3.6. Estudio de expresión de Lectina en la zona de peri-infarto	68
3.7. Estudio de expresión de VEGF en la zona de peri-infarto	69
3.8. Estudio de co-marcajes de CTM-MO en la zona de peri-infarto.	70
4. Variables de estudio de la comparativa entre CTM-MO y CTM-TA.....	70
4.1. Evaluación funcional	70
4.2. Tamaño de lesión analizado por RM y H&E	71
4.3. Inmunohistoquímica	73
4.3.1. Muerte celular	73
4.3.2. Proliferación celular	74
4.4. Determinación de citocinas pro-inflamatorias: TNF –alpha e IL-6	75
4.5. Estudio de la expresión de marcadores de reparación en la zona de peri-infarto.....	76
4.5.1. Expresión del marcador NF y BDNF	76
4.5.2. Expresión del marcador GFAP	77
4.5.3. Expresión del marcador Olig-2	78

4.5.4. Expresión del marcador SYP	80
4.5.5. Expresión del marcador VEGF	81
Discusión	83
1. Recuperación funcional e implantación de las CTM alogénicas en el infarto cerebral agudo	85
2. Efectos de la administración de CTM alogénicas por vía hemática tras infarto cerebral agudo. Mecanismo de acción	89
2.1. Tamaño de lesión, muerte y proliferación celular	89
2.2. Citocinas pro-inflamatorias	90
2.3. Mecanismos de reparación cerebral	91
Conclusiones	97
Bibliografía	101
Anexo	115

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

μl: microlitro

μm: micrómetro

ACA: arteria carótida anterior

ACC: arterias carótidas comunes

ACE: arteria carótida externa

ACI: arteria carótida interna

ACM: arteria cerebral media

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIT: ataque isquémico transitorio

ANOVA: análisis de la varianza

ATP: adenosín trifosfato

AVAD: años de vida ajustados según discapacidad

BCA: método del ácido bicinconínico

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés *brain derived neurotrophic factor*)

bFGF: factor de crecimiento de fibroblasto básico (del inglés *basic fibroblastic growth factor*)

BHE: barrera hematoencefálica

BSA: albúmina de suero bovina

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina

°C: grados centígrados

cm²: centímetros cuadrados

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CO₂: dióxido de carbono

CTD: células troncales dentales

CTE: células troncales embrionarias

CTH: células troncales hematopoyéticas

CTM: células troncales mesenquimales

CTM-MO: células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea

CTN: células troncales neurales

CTM-TA: células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo

CTSCU: células troncales de la sangre de cordón umbilical

DAB: diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

Dil: 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perclorato

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTP: deoxinucleótidos trifosfatos

ECG: electrocardiograma

ECL: *enzymatic chemiluminescence*

ECV: enfermedad cerebrovascular

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EEF: escala de evaluación funcional

ELISA: *enzyme linked immunoabsorbant assay*

FC: frecuencia cardiaca

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FSC: flujo sanguíneo cerebral

g: gramos

GFAP: proteína ácida fibrilar glial (del inglés *glial fibrillary acidic protein*)

G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos (del inglés *granulocyte colony-stimulating factor*)

h: horas

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos (del inglés *hepatocyte growth factor*)

HRP: peroxidasa de rábano (del inglés *horseradish peroxidase*).

H&E: hematoxilina – eosina

IC: infarto cerebral

IGF: factor de crecimiento de insulina (del inglés *insulin-like growth factor*)

IL-6: interleucina 6

i.c.: intracarotídea

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenosa

l: litro

min: minutos

ml: mililitro

NF: neurofilamento

NGF: factor de crecimiento nervioso (del inglés *nerve growth factor*)

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

OACC: oclusión de arterias carótidas comunes

OACM: oclusión de la arteria cerebral media

OMS: Organización Mundial de la Salud

OpACM: oclusión permanente de la arteria cerebral media

OtACM: oclusión transitoria de la arteria cerebral media

Olig-2: factor de transcripción 2 de oligodendrocitos

PA: presión arterial

PAd: presión arterial diastólica

PAm: presión arterial media

PAs: presión arterial sistólica

PBS: tampón fosfato salino (del inglés *phosphate buffered saline*)

pg/mL: picogramo/mililitro

PE: ficoeritrina

PF: parámetros fisiológicos

RM: resonancia magnética

r.p.m.: revoluciones por minuto

rtPA: activador de plasminógeno tisular recombinante

s: segundos

SDF-1: factor-1 derivado de células estromales (del inglés *stromal cell-derived factor-1*)

SNC: sistema nervioso central

SPIO: partículas de hierro supermagnético (del inglés *superparamagnetic iron oxide*)

STEPS: *Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke*

SYP: sinaptofisina

TBS: tampón Tris salino (del inglés *tris buffered saline*)

TdT: *Terminal deoxynucleotidyl transferase*

TNF-alpha: factor de necrosis tumoral alfa (del inglés *tumor necrosis factor*)

TUNEL: *TdT-mediated dUTP nick end labelling*

u.a: unidades arbitrarias

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés *vascular endothelial growth factor*)

ZSV: zona subventricular

RESUMEN

RESUMEN

Introducción:

Actualmente, además de los cuidados del ictus agudo, sólo la trombolisis intravenosa (i.v.) y perfusión ha demostrado ser un tratamiento eficaz en el infarto cerebral (IC), aunque debido a su corta ventana terapéutica, sólo un pequeño porcentaje de pacientes puede beneficiarse de éste. Por ello, es necesario investigar nuevas terapias que favorezcan la reparación de la unidad neurovascular y recuperación funcional después del IC. La plasticidad cerebral contiene mecanismos de reparación que se activan tras una lesión y que podrían estimularse mediante rehabilitación, así como la administración de factores tróficos y la terapia celular. Ésta última, podría ser una alternativa en el tratamiento del IC, sin embargo, es necesario profundizar en el estudio de ésta con modelos animales experimentales para poder responder a aspectos relacionados con las rutas de administración y las fuentes celulares idóneas para una posterior traslación clínica.

En un principio se planteó que la terapia celular idónea era la de procedencia autóloga, ya que no produciría rechazo inmunológico. Sin embargo, su principal limitación es que al precisar tiempo para su cultivo, sólo sería posible aplicarla varias semanas después del IC y no podría administrarse durante la fase aguda. Pero hoy en día, se ha demostrado que la fuente alogénica es segura y no genera problemas de incompatibilidad inmunológica, teniendo la ventaja de poder ser utilizada en fases tempranas del IC al disponer del material celular listo y pendiente sólo de su expansión.

Con respecto a las vías de administración, se han utilizado diversas rutas en modelos animales experimentales, siendo la mayor parte de ellas invasivas como la intracerebral, ya que se pensaba que era necesaria la llegada de las células al parénquima lesionado para obtener un efecto favorable sobre la reparación tisular. Sin embargo, existen otras vías menos invasivas como la intracarotídea (i.c.) y la i.v. que

podrían ser igualmente eficaces para su administración y, por tanto, más adecuadas para su traslación a la clínica.

En cuanto a la estirpe celular, se han utilizado células embrionarias, neurales, hematopoyéticas y células troncales mesenquimales (CTM), mostrando todas eficacia, aunque algunas son de difícil obtención y plantean problemas éticos. Las CTM, gracias a su fácil disponibilidad, bajo grado de rechazo inmunológico y que su uso no conlleva conflictos éticos, podrían ser buenas candidatas para la traslación clínica. Las CTM se encuentran en la mayoría de los tejidos adultos y se pueden aislar de diferentes fuentes como médula ósea y tejido adiposo entre otras. La fuente de tejido adiposo es realmente abundante y accesible obteniéndose a partir de lipoaspirados por motivos terapéuticos.

Hipótesis:

La administración intracerebral de células troncales alogénicas en modelos de infarto cerebral en animales de experimentación ha mostrado un efecto favorable en la recuperación funcional. Sin embargo, la administración i.c. o i.v. de células troncales mesenquimales alogénicas derivadas de médula ósea o tejido adiposo también podría favorecer la recuperación funcional tras el infarto cerebral experimental por oclusión permanente de la arteria cerebral media, posiblemente, a través de la estimulación de mecanismos de protección y reparación en el cerebro lesionado.

Objetivos:

En un modelo experimental en ratas de infarto cerebral agudo por oclusión permanente de la arteria cerebral media pretendemos:

1. Analizar el efecto de la administración i.c. e i.v. de CTM alogénicas derivadas de médula ósea sobre la recuperación funcional.
2. Comparar el efecto terapéutico de la administración i.v. de CTM alogénicas derivadas de tejido adiposo (CTM-TA) frente a CTM alogénicas derivadas de médula ósea (CTM-MO).

3. Analizar los mecanismos de protección y reparación cerebral por los que la administración por vía hemática de CTM-MO y CTM-TA alogénicas podrían favorecer la recuperación funcional.

Material y métodos:

Se utilizaron ratas macho adultas Sprague-Dawley (250-320g) distribuidas en 7 grupos (n=10/grupo): 1) sham i.v.; 2) sham i.c.; 3) control i.v.; 4) control i.c.; 5) CTM-MO i.v.; 6) CTM-MO i.c.; 7) CTM-TA i.v. Los animales sham fueron sometidos a todo el procedimiento quirúrgico a excepción de la isquemia cerebral y se les administró suero salino por vía i.v. o i.c. El resto de animales fueron sometidos a oclusión permanente de la arteria cerebral media (OpACM) con ligadura transitoria de arterias carótidas comunes (ACC) durante 60min y a los 30min después de la desoclusión de las mismas se administró a los grupos control suero salino por vía i.v. e i.c. y a los grupos de tratamiento, CTM-MO (2×10^6 células) por vía i.v. e i.c. y CTM-TA (2×10^6 células) por vía i.v. Los animales se sacrificaron a los 14 días.

Tras la obtención de CTM procedentes de médula ósea y tejido adiposo en ratas adultas Sprague-Dawley, se llevó a cabo el aislamiento y caracterización de éstas por citometría de flujo. En las ratas objeto de estudio, se realizó a las 24h la evaluación funcional mediante la escala de Rogers y el test de Rota-Rod, así como la implantación celular y tamaño de lesión se estudiaron mediante Resonancia Magnética (RM). A los 14 días se analizó: la evaluación funcional mediante la escala de Rogers y el test de Rota-Rod, así como la implantación celular por RM e inmunofluorescencia, tamaño de lesión por RM y Hematoxilina-Eosina (H&E), muerte celular por TUNEL, proliferación celular por 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-6) en plasma, nº de vasos sanguíneos y co-marcajes de Dil y BrdU por inmunofluorescencia, marcadores de reparación cerebral: neurofilamento (NF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), factor de transcripción 2 de oligodendrocitos (Olig-2), sinaptofisina (SYP) y factor de

crecimiento del endotelio vascular (VEGF) a través de inmunofluorescencia y cuantificación de proteínas por Western Blot.

Resultados:

Ambas vías de administración, i.v e i.c de CTM alogénicas, mostraron una buena recuperación funcional en comparación con los grupos control ($P<0,05$) por el test de Rogers a las 24h y 14 días. El grupo sham obtuvo una puntuación de 0 en todas las evaluaciones, no mostrando déficit funcional. Sólo se observó implantación celular en la zona de la lesión cuando las células fueron administradas por vía i.c. pero no por i.v. tanto a las 24h como a los 14 días después el IC. Independientemente de la vía de administración, ningún grupo de tratamiento redujo el tamaño de lesión de manera significativa con respecto a los grupos control; sin embargo, hubo una reducción de la muerte celular así como un aumento de la proliferación celular en la zona de peri-infarto con respecto a los grupos control ($P<0,05$). El grupo sham no mostró proliferación celular ni muerte celular ya que no se encontraron células con marcaje positivo para BrdU ni TUNEL. En la respuesta inflamatoria en plasma a los 14 días, se observó un aumento de TNF- α e IL-6 en el grupo CTM-MO i.v. y una disminución en el grupo CTM-MO i.c. ($P<0,05$). Por otro lado, al analizar el marcador estructural de vasos sanguíneos, Lectina, se observó un aumento de su expresión en la zona de peri-infarto a los 14 días después del IC en los grupos de tratamiento con CTM-MO, independientemente de la vía de administración, en comparación a los grupos control. Al analizar la expresión del marcador de vasculogénesis, VEGF, se observó que ambas vías de administración de CTM-MO aumentaban la expresión de este marcador en la zona de peri-infarto pero sólo la administración i.c. alcanzó significancia ($P<0,05$).

Por otro lado, cuando se comparó la administración i.v. de CTM-MO y CTM-TA alogénicas, se observó que ambas fuentes celulares, mostraron una buena recuperación funcional ($P<0,05$) por el test de Rogers y Rota-Rod a las 24h y 14 días después del IC. Sin embargo, ninguno de estos grupos de tratamiento redujo el

tamaño de lesión con respecto al grupo control, aunque sí se observó una reducción de la muerte celular así como, un aumento de la proliferación significativo en la zona de peri-infarto con respecto al grupo control ($P<0,05$). El grupo sham no mostró proliferación ni muerte celular ya que no se encontraron células con marcaje positivo para BrdU ni TUNEL.

Los marcadores de respuesta inflamatoria en plasma a los 14 días, mostraron un claro aumento de TNF- α e IL-6 en los grupos de tratamiento con CTM-MO y CTM-TA ($P<0,05$).

Por último, el estudio de los marcadores de reparación cerebral en la zona peri-infarto a los 14 días después del IC demostró en ambos grupos de tratamiento, CTM-MO y CTM-TA, un incremento evidente de la expresión de NF, Olig-2, SYP y VEGF, así como una reducción del marcador glial GFAP ($P<0,05$).

Conclusiones:

En un modelo experimental en ratas de infarto cerebral agudo por oclusión permanente de la arteria cerebral media observamos:

1. La administración de células troncales mesenquimales alogénicas tanto por vía intracarotídea como intravenosa, es eficaz en la recuperación funcional.
2. El tratamiento con células troncales mesenquimales alogénicas procedentes de tejido adiposo es tan eficaz como las procedentes de médula ósea para favorecer la recuperación funcional.
3. La administración por vía hemática de células troncales mesenquimales alogénicas derivadas de médula ósea y tejido adiposo favorecen la recuperación funcional al potenciar mecanismos protectores (disminución de muerte celular y de gliosis) y reparadores (aumento de proliferación celular y expresión de marcadores implicados en neurogénesis, oligodendrogénesis, sinaptogénesis y angiogénesis) de la lesión cerebral.

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La enfermedad cerebrovascular (ECV) o ictus se refiere a todo trastorno en el que un área del encéfalo se afecta de forma transitoria o permanente por una isquemia o hemorragia, estando uno o más vasos sanguíneos cerebrales afectados por un proceso patológico¹. Según la naturaleza de la lesión producida, existen diversos tipos de ictus, un 85% son de tipo isquémico frente a un 15 % que son hemorrágicos.

La isquemia cerebral focal se produce por una reducción del flujo sanguíneo cerebral (FSC) en una región del encéfalo al obstruirse una determinada arteria cerebral con la consiguiente a necrosis tisular y déficit neurológico secundario. Dependiendo de la duración de la interrupción del FSC dará lugar a un ictus o infarto cerebral (IC) si es permanente, o a un ataque isquémico transitorio (AIT) si se trata de un episodio breve de disfunción neurológica, con síntomas clínicos que duran habitualmente menos de una hora y sin evidencia de infarto en las técnicas de neuroimagen.

La gravedad del IC va a venir determinada por el tiempo de oclusión arterial, la arteria afectada y la extensión del tejido lesionado.

1.1. Carga epidemiológica de la enfermedad

Las ECV tienen una alta incidencia y prevalencia, son responsables de hasta un 10% del total de muertes en el mundo y suponen uno de los principales motivos de hospitalización y de utilización de recursos económicos de los sistemas sanitarios². Según la OMS, el ictus representa la tercera causa de muerte y la primera causa de minusvalía en adultos en el mundo. En España, es la segunda causa de muerte y la primera en la mujer³, siendo la incidencia estimada de 187 casos anuales por 100,000 habitantes⁴. Esta enfermedad representa la mayor causa de incapacidad teniendo secuelas hasta el 90% de los pacientes que en el 30% los incapacitan para realizar sus actividades habituales⁵.

Aunque la implantación del código ictus, la monitorización en unidad de ictus, la trombolisis y reperfusión precoz y el inicio rápido de tratamiento preventivo y rehabilitación, han permitido reducir de manera muy importante la mortalidad y dependencia del IC, éste sigue siendo un importante problema de salud. El ictus consume hasta el 4% del presupuesto sanitario global en España y ocupa el segundo lugar en cuanto a carga de enfermedad en Europa (responsable del 6.8% de la pérdida de Años de Vida Ajustados por Discapacidad- AVAD)⁶.

Todo esto supone un auténtico problema de salud que obliga a identificar las mejores pautas de prevención y tratamiento para reducir la incidencia y las dependencias producidas por la enfermedad.

2. PATOGENIA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

La isquemia cerebral es el resultado de una disminución del FSC hasta un nivel insuficiente para mantener la homeostasis tisular y que va a provocar alteraciones metabólicas y bioquímicas que conducen a la muerte celular, ya sea por necrosis o apoptosis, alterando el funcionamiento del sistema nervioso.

El FSC es una variable dependiente del gradiente de presión de la sangre y de la resistencia vascular. En condiciones normales, el FSC es de 55-100mL/100g/min, lo que asegura un aporte continuo de oxígeno y glucosa, necesarios para mantener los potenciales de membrana celular, la síntesis y la liberación de neurotransmisores. Cuando se produce la oclusión arterial, la intensidad de reducción del FSC residual no es la misma en toda el área de tejido afectado. Se distinguen diferentes regiones dentro de la zona afectada en función del FSC que reciban. Existe una zona central del IC denominada núcleo, donde su FSC se encuentra por debajo de 10mL/100g/min, produciendo una rápida muerte celular⁷. Además, existe otra zona denominada “área de penumbra isquémica”⁸ o de “peri-infarto”, con una perfusión cerebral críticamente

disminuida ($FSC < 22 \text{ mL}/100 \text{ g}/\text{min}$), pero en la que el consumo de oxígeno es todavía suficiente para preservar la supervivencia tisular (perfusión de miseria)⁹. Esta zona es mantenida por la circulación colateral y tiende a evolucionar a IC si el deterioro del FSC persiste y no es controlada adecuadamente^{10,11} (Figura 1).

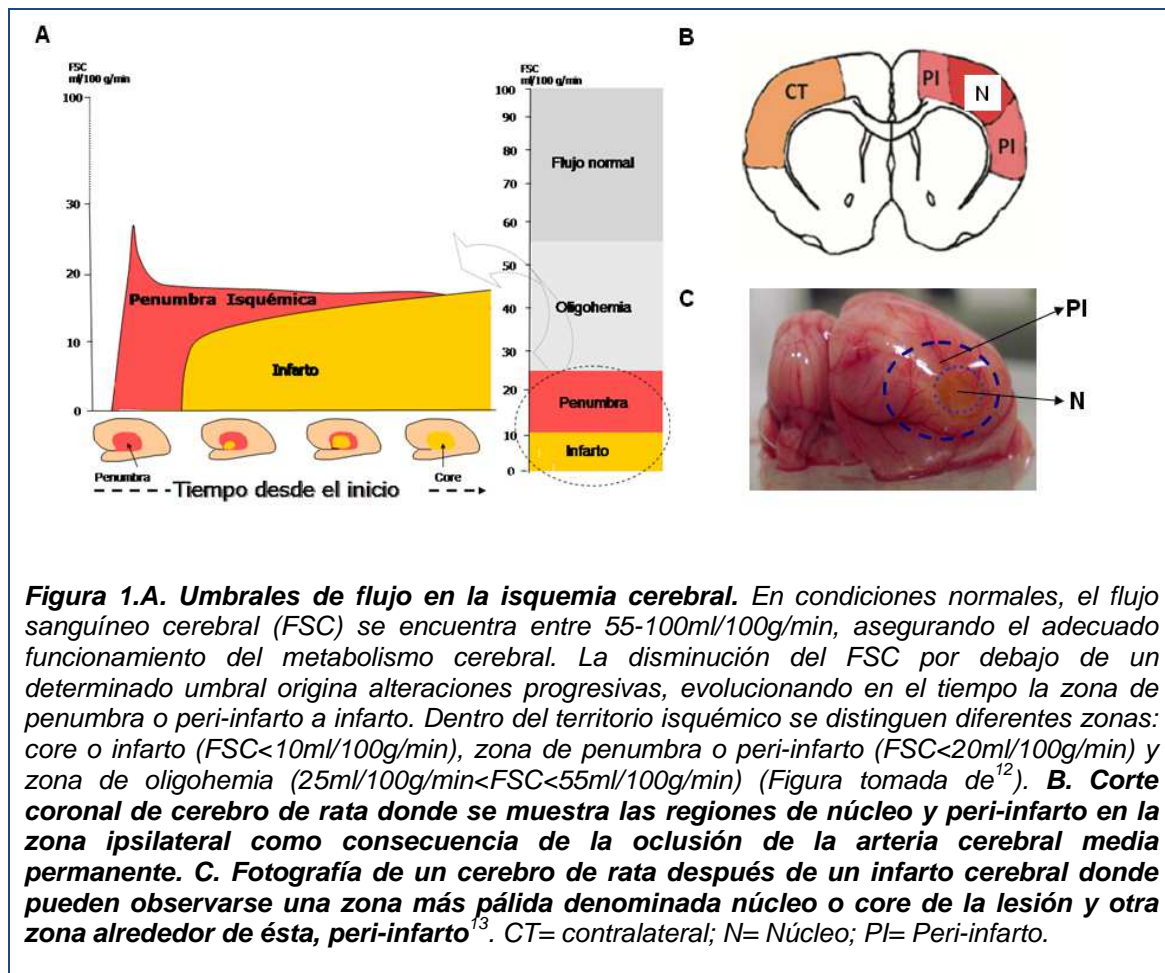


Figura 1.A. Umbrales de flujo en la isquemia cerebral. En condiciones normales, el flujo sanguíneo cerebral (FSC) se encuentra entre 55-100ml/100g/min, asegurando el adecuado funcionamiento del metabolismo cerebral. La disminución del FSC por debajo de un determinado umbral origina alteraciones progresivas, evolucionando en el tiempo la zona de penumbra o peri-infarto a infarto. Dentro del territorio isquémico se distinguen diferentes zonas: core o infarto ($FSC < 10 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$), zona de penumbra o peri-infarto ($FSC < 20 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$) y zona de oligohemia ($25 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min} < FSC < 55 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$) (Figura tomada de¹²). **B. Corte coronal de cerebro de rata** donde se muestra las regiones de núcleo y peri-infarto en la zona ipsilateral como consecuencia de la oclusión de la arteria cerebral media permanente. **C. Fotografía de un cerebro de rata** después de un infarto cerebral donde pueden observarse una zona más pálida denominada núcleo o core de la lesión y otra zona alrededor de ésta, peri-infarto¹³. CT= contralateral; N= Núcleo; PI= Peri-infarto.

La zona de peri-infarto está sometida a una ola de procesos metabólicos deletéreos propagados desde el núcleo isquémico, como estrés oxidativo y respuesta inflamatoria entre otros, conduciendo a la expansión del núcleo del infarto¹⁴. La progresión del daño celular en este tejido “en riesgo” hacia la irreversibilidad y la muerte es mediada por la puesta en marcha de una cascada de factores desencadenados por la alteración funcional iniciada por la isquemia como son: acidosis, síntesis en exceso de óxido nítrico (NO), liberación masiva de

neurotransmisores excitadores, sobrecarga citosólica de calcio, exceso de radicales libres, peroxidación lipídica, respuesta inflamatoria exagerada, expresión de genes inductores de apoptosis e inflamación^{15,16}. La mayor parte se desencadena en fases tempranas de la isquemia cerebral, pero algunos de ellos tienen expresión más tardía, lo cual contribuye a explicar la progresión del daño durante horas y días después de ocurrida la isquemia, aunque ésta no se agrave o a pesar de que haya reperusión¹⁷. El período de tiempo durante el cual persiste el área de penumbra representa una ventana potencial de oportunidad terapéutica que depende fundamentalmente de la intensidad de la isquemia, del FSC residual procedente de colaterales, de factores sistémicos como la glucemia, presión arterial, temperatura corporal¹⁸ y de la vulnerabilidad selectiva del tejido neuronal afectado.

Las alteraciones ocurridas tras la isquemia cerebral afectan a todas las estirpes celulares aunque se debe considerar que existe una vulnerabilidad celular selectiva ante el daño. Las neuronas del hipocampo, núcleo amigdalino, corteza cerebral y cerebelo son más sensibles a la isquemia cerebral y sufren cambios estructurales más precozmente que las neuronas de otras localizaciones y que las células gliales¹⁹. Además de esta vulnerabilidad, hay que tener en cuenta que los mecanismos de la isquemia cerebral son diferentes en la sustancia blanca y gris del cerebro, siendo esta última más susceptible tras la lesión²⁰.

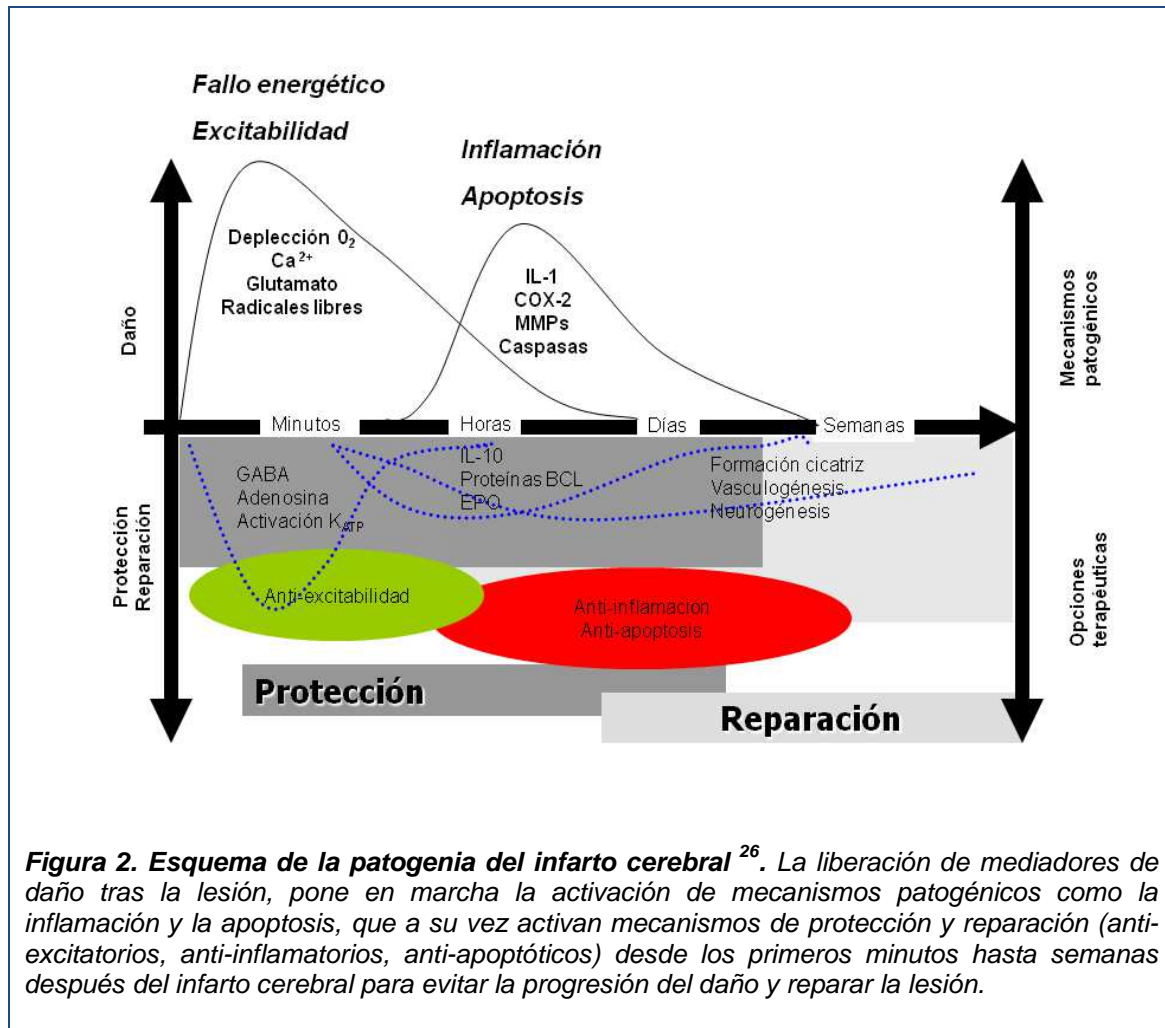
Entre el inicio del IC y la muerte celular se desarrolla una serie de reacciones químicas que son responsables de la progresión del daño, la denominada cascada isquémica. En ésta se produce la liberación de mediadores de daño, entre los que se incluyen, la muerte celular y la respuesta inflamatoria.

En la isquemia cerebral focal se distinguen dos tipos de muerte celular, la necrosis y apoptosis, que se diferencian por marcadores morfológicos y también bioquímicos al ser inducidos por diferentes mecanismos (p53, BAX, etc.)^{21,22}. La necrosis se caracteriza por el hinchamiento de la célula y la lisis celular, induciendo una respuesta inflamatoria²³. Es un fenómeno pasivo que depende de las alteraciones bioquímicas

producidas por el déficit energético. Se basa en fenómenos de excitabilidad que desencadenan el incremento citoplasmático de calcio a través de los distintos tipos de canales, la activación de enzimas líticas constitutivas que destruyen componentes celulares, como es el exceso del NO, así como la respuesta inflamatoria y el exceso de radicales libres, que tendrían un papel fundamental durante la reperusión^{15, 16, 24}. La apoptosis o muerte celular programada es un fenómeno activo, que al contrario que la necrosis, requiere de ATP. En la zona de penumbra, las neuronas mueren principalmente por este mecanismo que se caracteriza por la fragmentación de ADN, condensación de la cromatina citoplasmática y ruptura de la célula en numerosas vesículas denominadas cuerpos apoptóticos que son fagocitados, impidiendo la liberación del contenido citoplasmático y, por tanto, la respuesta inflamatoria.

La inflamación se caracteriza por la acumulación de células inflamatorias y mediadores inflamatorios en la lesión y zona de peri-infarto. Una importante diana de inflamación es la unidad neurovascular, formada por neuronas, glía y células endoteliales. Además incluye elementos sanguíneos circulantes, células presentadoras de antígenos perivasculares y astrocitos²⁵. La respuesta inflamatoria se ha asociado a un aumento de daño cerebral y un peor pronóstico. Sin embargo, ésta es necesaria para limpiar los elementos dañados, así como para iniciar los procesos de neovascularización y reparación.

Como consecuencia de la liberación de estos mediadores de daño, se activan respuestas de protección y reparación a partir de los primeros minutos del daño y se prolongan en el tiempo hasta semanas e incluso meses (Figura 2). Diferentes procesos inter-relacionados como neurogénesis, gliagénesis, oligodendrogénesis, sinaptogénesis, remielinización y plasticidad axonal y angiogénesis se activan para evitar la progresión del daño y reparar la lesión.



Después de un ictus, la neurogénesis adulta es activada en la zona subventricular (ZSV) y en el giro dentado. La población de neuroblastos es reclutada hacia las áreas que bordean el infarto y allí se diferencian a neuronas, produciendo un reemplazamiento de la pérdida neuronal²⁷. La neurogénesis y la migración de neuroblastos están altamente asociados con la vasculatura y el remodelado de vasos sanguíneos después del IC²⁸. Los procesos de neurogénesis son estimulados por los mecanismos de angiogénesis²⁹, y además existen numerosos factores de crecimiento, en especial el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que se encuentra implicado en ambos procesos³⁰.

La sinaptogénesis es otro mecanismo compensatorio que se activa tras la lesión y en el que participa la sinaptofisina (SYP), una proteína presente en las vesículas

sinápticas de todas las terminales nerviosas, involucrada en la endocitosis y reciclado de estas vesículas, jugando un papel importante en la función sináptica³¹.

Lo mismo ocurre con la gliagénesis, donde participa la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), principal componente de los filamentos intermedios del citoesqueleto que forman los astrocitos. Éstos juegan un papel importante en el remodelamiento después de la isquemia, aunque por el momento no se sabe muy bien si su acción es beneficiosa o perjudicial. Una vez activados los astrocitos, participan en procesos de reparación de los tejidos mediante la eliminación de residuos³² y forman la cicatriz glial, siendo ésta última el principal obstáculo para la regeneración axonal de neuronas³³.

Por otro lado, se han estudiado diferentes moléculas o compuestos que promueven y/o modulan la plasticidad sináptica después del daño como es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)³⁴, generando microambientes en el cerebro dañado que potencian la plasticidad neural con una mejora funcional después del IC³⁵.

3. PLASTICIDAD, PROTECCIÓN Y REPARACIÓN EN INFARTO CEREBRAL

La mayoría de los tratamientos farmacológicos orientados a la protección tisular en la isquemia cerebral han tenido eficacia en los estudios animales pero han fracasado en la clínica. Sólo los cuidados del ictus agudo y terapias reperfusionas, como el tratamiento trombolítico (rtPA), han demostrado ser eficaces. Sin embargo, sólo pueden beneficiarse de éste último un reducido porcentaje de pacientes debido a su corta ventana terapéutica³⁶. Como es sabido, el factor tiempo es crucial para salvar la mayor cantidad de tejido en penumbra isquémica. El concepto de ventana terapéutica³⁷ implica un período durante el cual la restitución del FSC regional y otras medidas citoprotectoras pueden evitar la muerte de las células potencialmente viables, mientras que, si este tiempo se sobrepasa, cualquier medida terapéutica no resultará

beneficiosa. En términos generales, cuanto más precoz sea la instauración del tratamiento mayor será la probabilidad de un efecto beneficioso.

La rápida disminución del FSC seguida de una reducción de ATP y depleción de energía durante el IC, desencadena la activación de procesos patogénicos y una variedad de respuestas de la unidad neurovascular. En el pasado, la mayoría de las terapias protectoras para el IC iban dirigidas a la supervivencia de las células neurales³⁸, sin embargo, hoy en día es sabido que como consecuencia de un IC es la integridad de la unidad neurovascular²⁵ la que queda comprometida por diferentes mecanismos. Por tanto, es necesario preservar todas las estructuras que componen ésta, incluyendo microvasos (células endoteliales, lámina basal y pericitos), neuronas y sus axones, astrocitos y otras células de soporte como la oligodendroglía³⁹. Por esta razón, el concepto de neuroprotección debería ser cambiado por cerebroprotección, englobando a todo el órgano.

Además, protección y reparación, mecanismos activados tras el daño, deben ser considerados como un continuo en el contexto de la plasticidad cerebral²⁶. Ésta es un proceso natural que se potencia tras la lesión e incluye procesos interrelacionados como neurogénesis, sinaptogénesis, regeneración axonal, oligodendrogénesis, remielinización y angiogénesis contribuyendo a la reparación de la unidad neurovascular. Por tanto, desde un punto de vista terapéutico, es importante encontrar terapias protectoras y reparadoras basadas en potenciar los mecanismos de plasticidad cerebral⁴⁰. Ésta se favorece mediante la estimulación cerebral a través de la rehabilitación, y también se podría beneficiar por la administración de factores tróficos, sustancias con efecto trófico y células troncales.

4. LA TERAPIA CELULAR EN EL INFARTO CEREBRAL

La terapia celular es una nueva vía en el desarrollo de nuevos tratamientos para diversas enfermedades neurológicas, incluido el IC. Los resultados obtenidos en

estudios preclínicos y clínicos han demostrado que esta terapia mejora la evolución tras sufrir un IC⁴¹.

Las células troncales son células inmaduras con capacidad de auto-renovación, viabilidad a largo plazo y dependiendo de su origen, se pueden diferenciar a múltiples tipos celulares. En el IC se han ensayado terapias con células troncales embrionarias (CTE), células troncales de estirpe neural (CTN), células troncales hematopoyéticas (CTH), células troncales procedentes de cordón umbilical (CTSCU), células troncales mesenquimales (CTM), células troncales dentales (CTD), células troncales de placenta y algunas líneas celulares inmortalizadas entre otras. Sin embargo, los mecanismos por los cuáles se produce esa mejora en la recuperación funcional son aún desconocidos. Es posible que estas células promuevan mecanismos de protección y reparación cerebral como neurogénesis, sinaptogénesis, angiogénesis, remielinización y crecimiento axonal.

Como se ha mencionado anteriormente, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios con células troncales para el tratamiento del IC. Sin embargo, es necesario profundizar en el estudio de esta terapia tanto en modelos animales como en clínica para poder responder a importantes cuestiones para mejorar los resultados en la traslación a la clínica como son el tipo celular, ventana terapéutica, vía de administración y rango de dosis.

5. MODELOS ANIMALES DE INFARTO CEREBRAL

La experimentación animal es fundamental para poder conocer los fenómenos patogénicos y fisiopatológicos que acontecen durante la isquemia cerebral, así como para poder probar diversas estrategias terapéuticas antes de ser ensayadas en humanos. Un modelo animal debe de cumplir una serie de condiciones para ser considerado de utilidad. En primer lugar debe ser factible y sencillo. Debe remedar la clínica humana y debe ser fácilmente reproducible y presentar la menor variabilidad

posible inter e intra observador. Se han desarrollado varios modelos experimentales de IC y aunque se han utilizado distintos animales, el animal más ampliamente utilizado es el de roedores. Entre las características que hacen a estos animales los más idóneos para su uso han sido: facilidad de manejo y de monitorización fisiológica, pequeño tamaño, grado de homología genética⁴² y la similitud en la anatomía y fisiología de la vasculatura cerebral entre éstos y humanos⁴³.

Existen diversos modelos de isquemia cerebral focal aunque los más utilizados en la actualidad son: ligadura de la arteria cerebral media (ACM) tras craneotomía, oclusión intraluminal de ACM mediante la introducción de un filamento desde la arteria carótida interna (ACI), oclusión por embolia con coágulo de sangre autóloga, inducción fotoquímica de trombosis intravascular y el de ratas espontáneamente hipertensas^{44,45}.

El modelo de la ACM tras craneotomía fue desarrollado por primera vez por Tamura⁴⁶ produciendo la oclusión de la ACM mediante coagulación de la porción proximal de la misma tras craneotomía suboccipital. Posteriormente se han ido introduciendo variantes, como el modelo descrito por Chen⁴⁷ y Liu⁴⁸, donde se realiza una pequeña craneotomía sobre la región de ACM, la cual se liga justo antes de la bifurcación entre la rama frontal y parietal con el fin de conseguir una lesión cortical^{49,50}. Seguidamente, se produce una oclusión transitoria de las dos arterias carótidas comunes, para eliminar el efecto de la circulación colateral y reducir la variabilidad en el tamaño del infarto.

5.1. Terapia celular en el infarto cerebral en modelos animales.

La mayoría de los estudios en terapia celular con animales han sido realizados en fases tardías del IC⁵¹. En muchos de estos estudios se observó una mejora funcional pero no una reducción del volumen de infarto⁵²⁻⁵⁴. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo estudios en fases más precoces para evaluar el posible efecto de la administración de las células en la protección y reparación cerebral tras el IC.

En cuanto a la procedencia celular, éstas pueden ser xenogénicas (proceden de otra especie, por lo que sólo se ensaya en modelos animales), autólogas (células procedentes del mismo individuo) y alogénicas (procedente de diferente individuo, pero de la misma especie). Diversos efectos adversos como el rechazo inmunológico pueden contribuir a ciertas complicaciones tras la administración de las células, por lo que en un principio la terapia más segura sería la autóloga ya que eliminaría el riesgo total de rechazo. Sin embargo, su principal limitación es que sólo sería posible aplicar esta terapia varias semanas después del ictus ya que se necesitaría tiempo para su cultivo, por lo que no podrían administrarse durante la fase aguda. Por otro lado, estudios en animales han demostrado que las células alogénicas son seguras y no producen rechazo^{53,55} gracias a su capacidad inmunomoduladora y no expresar antígenos CMH de clase II por lo que son una buena alternativa en el tratamiento del IC. Estas células carecen de antígenos del complejo de histocompatibilidad (HLA)^{56,57} y de moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86. Aunque poseen bajos niveles de expresión de antígenos CMH de clase I que pueden activar a las células T, la ausencia de moléculas coestimuladoras permite que no se inicie una respuesta secundaria, dejando a las células T anérgicas⁵⁸. Por todo ello, no sería necesario el uso de inmunosupresores con la administración de CTM siendo tolerogénicas e inmunomoduladoras⁵⁹, a diferencia de las células embrionarias.

Con respecto a la ruta de administración más idónea, ésta es aún desconocida. Se han ensayado diferentes rutas intracerebrales^{55,60,61} mediante métodos invasivos con la inyección *in situ* de las células en el lugar de la lesión, ya que se pensaba que era necesario la implantación de las mismas para observar la mejoría funcional. Sin embargo, otras vías menos invasivas como, intracarotidea (i.c.)^{53,62,63}, intravenosa (i.v.)^{52,64} e intranasal⁶⁵ podrían ser más apropiadas para su traslación a la clínica.

Otro aspecto a tener en cuenta sería la estirpe celular. Diferentes líneas celulares como las CTE, HSC y CTM⁶⁶⁻⁷⁰ se han utilizado en modelos animales de IC. De entre todas ellas, nos centraremos en las CTM, al ser las más empleadas en modelos

animales de IC⁵¹. Éstas fueron descritas por primera vez en la médula ósea adulta por Alexander Friedenstein en la década de los 70's y su número se estima en un 0,01% del total de las células de la médula ósea⁷¹, siendo esta proporción muy baja en comparación con otras poblaciones celulares. Las CTM tienen una serie de características que las hacen buenas candidatas para el tratamiento, entre las que destacamos su capacidad de autorrenovación durante largos períodos de tiempo, su multipotencia pudiendo diferenciarse a diferentes linajes celulares como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, neuronas y glía⁷², su capacidad para reparar tejidos tanto *in vitro* como *in vivo*⁷³ y su fácil obtención, pudiendo aislarse de diferentes fuentes como médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, líquido amniótico, placenta y membrana sinovial, entre otras⁷⁴.

Diferentes estudios han mostrado que estas células promueven la recuperación funcional^{75,76}, reducen el volumen de lesión, se diferencian hacia neuronas y oligodendrocitos y disminuyen la proliferación de células inflamatorias⁷⁷.

Por último, se han utilizado diferentes dosis de administración de CTM^{41,51} aunque actualmente no está claro cuál sería la más eficaz y si serviría con una única administración o podría haber un beneficio después de las llamadas "dosis de refuerzo" que podrían aumentar el efecto clínico⁷⁸. Han sido utilizadas diferentes dosis de CTM como se aprecia en los principales estudios experimentales en animales (Tabla 1).

Aunque existen muchas evidencias de los efectos beneficiosos de la administración de células troncales en modelos animales de IC, los procesos que subyacen a esa buena recuperación funcional son aún desconocidos.

Tabla 1. Estudios experimentales en animales con CTM en infarto cerebral (Fuente, dosis, tipo de administración, tiempo y ruta de administración).

Esta tabla recoge los principales estudios de administración de CTM en modelos experimentales animales de infarto cerebral. Estos estudios utilizaron como fuente celular la médula ósea o tejido adiposo; la dosis de CTM osciló entre 1×10^5 y 3×10^6 ; la procedencia de las CTM fue xenogénica, autóloga o alogénica; el tiempo de administración oscilaba entre horas a días tras el infarto cerebral. Finalmente, la ruta de administración de las CTM fue intracerebral o hemática. En la mayoría de los trabajos se observó que tras la administración de CTM, se obtuvo una buena recuperación funcional.

MODELOS ANIMALES						
Estudio	Fuente celular	Dosis	Tipo de administración	Tiempo de administración	Ruta de administración	Resultados
Li <i>et al</i> ; 2000	Médula ósea	1×10^5 cells	Alogénicas	4 días tras infarto	Intraestriatal	Mejora recuperación funcional
Chen <i>et al</i> ; 2001	Médula ósea	1×10^6 cells 3×10^6 cells	Alogénicas	1 día o 7 días tras infarto	Intravenosa (vena cola)	Recuperación funcional. Mejora la supervivencia celular
Shen <i>et al</i> ; 2006	Médula ósea	2×10^6 cells	Alogénicas	24 h	Intracarotídea	Mejora recuperación funcional, Incrementa sinaptofisina y NGA en la zona de periinfarto
Yang <i>et al</i> ; 2010	Médula ósea	5×10^5 cells	Alogénicas o xenogénicas	1 o 7 días tras infarto	Intravenosa (vena cola)	Recuperación funcional y estructural, incremento de citocinas circulantes y factores de crecimiento
Leu <i>et al</i> ; 2010	Tejido adiposo	2×10^6 cells	Autólogas	0, 12 y 24 h tras infarto	Intravenosa	Reduce volumen lesión, Mejora recuperación funcional a través de potenciar angiogénesis/vasculogénesis y neurogénesis, efecto anti-inflamatorio y anti-apoptótico
Li <i>et al</i> ; 2012	Tejido adiposo	2×10^6 cells	Autólogas	0 h y 12 h tras infarto transitorio	Intravenosa	Reduce tamaño de lesión y disminuye la apoptosis
Mitkari <i>et al</i> ; 2013	Médula ósea	1.1×10^6 0.5×10^6	Xenogénicas	24 h tras infarto	Intracarotídea	Esta administración es segura y eficiente
Ishizaka <i>et al</i> ; 2013	Médula ósea	1×10^6	Xenogénicas	1, 4 ó 7 días tras infarto	Intracarotídea	Buena recuperación funcional y efectos protectores cuando se administran en día 1 y 4.

6. TRASLACIÓN CLÍNICA DE LA TERAPIA CELULAR EN EL INFARTO CEREBRAL

Desde el punto de vista clínico, las CTM han sido administradas con éxito en el cerebro de pacientes con ictus con excelente tolerancia y sin complicaciones. Así, la implantación esterotáxica de CTM autólogas de médula ósea en 5 pacientes con IC mostró la seguridad del procedimiento y la tolerancia de la administración, sin observarse efectos adversos importantes durante el año de seguimiento, además de cierta mejoría neurológica de los pacientes, si bien no se pudieron obtener resultados concluyentes dado el pequeño tamaño muestral⁷⁹. Aunque algunos investigadores siguen ensayando la administración intracerebral de células troncales, como el estudio PISCES (CTXCOE03)⁸⁰, cada vez cobra más interés la administración i.v de CTM, al tratarse de un procedimiento menos invasivo, y por tanto más seguro. Un ensayo clínico llevado a cabo por Bang y colaboradores, examinó la viabilidad, eficacia y seguridad de la administración i.v. de CTM autólogas en 5 pacientes con IC grave. Dicho tratamiento mostró ser factible y seguro, mejorando la recuperación neurológica de estos pacientes⁸¹. En otro estudio se evaluó la seguridad a largo plazo y eficacia de la administración i.v de CTM en 85 pacientes con IC. En este caso, el tratamiento fue seguro observándose una buena recuperación en los pacientes⁸².

En definitiva, los progresos en este campo han abierto una nueva y prometedora vía en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en el ictus favoreciendo la plasticidad cerebral, lo que complementaría el actual tratamiento del IC. Sin embargo, es conocida la dificultad que existe en el diseño de nuevos ensayos clínicos que puedan demostrar eficacia debido a un número de complicaciones éticas, técnicas y clínicas⁸³. En 2007 se llevó a cabo una reunión de expertos en el campo, STEPS (*Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke*), que sentó las bases para acelerar la investigación de la terapia celular en el IC y hacer frente a una serie de cuestiones pendientes tanto en modelos animales como en la clínica⁸⁴ como son el tipo

celular más eficaz, así como, el tiempo y la ruta de administración óptimos. En el 2010, se llevó a cabo una segunda reunión (STEPS II) entre investigadores básicos, clínicos, representantes de la industria y de los institutos nacionales de la salud para elaborar nuevas recomendaciones con el objetivo de que no fracasara la terapia celular cuando se hiciera su traslación a la clínica, como ocurrió con los fármacos protectores cerebrales. En esta reunión se concluyó que aún existían muchos vacíos en el conocimiento de la terapia celular y que era necesario profundizar en futuras investigaciones como el refinamiento de las técnicas de marcaje celular, su posterior seguimiento por técnicas de imagen y desarrollo de marcadores de recuperación tras el IC⁸⁵.

Con todo lo mencionado anteriormente se demuestra que pocos estudios han evaluado el posible efecto beneficioso de la administración de células troncales alogénicas en las fases precoces del IC y por lo tanto, sería una buena oportunidad evaluar su eficacia en esta fase mediante la estimulación de la plasticidad cerebral e identificar la vía y la estirpe celular más apropiada para su posterior traslación clínica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Con estos antecedentes nos planteamos la siguiente hipótesis:

Hipótesis:

La administración intracerebral de células troncales alogénicas en modelos de infarto cerebral en animales de experimentación ha mostrado un efecto favorable en la recuperación funcional. Sin embargo, la administración i.c. o i.v de células troncales mesenquimales alogénicas derivadas de médula ósea o tejido adiposo también podría favorecer la recuperación funcional tras el infarto cerebral experimental por oclusión permanente de la arteria cerebral media, posiblemente, a través de la estimulación de mecanismos de protección y reparación en el cerebro lesionado.

Objetivos:

En un modelo experimental en ratas de infarto cerebral agudo por oclusión permanente de la arteria cerebral media pretendemos:

1. Analizar el efecto de la administración i.c. e i.v. de CTM alogénicas derivadas de médula ósea sobre la recuperación funcional.
2. Comparar el efecto terapéutico de la administración i.v. de CTM alogénicas derivadas de tejido adiposo (CTM-TA) frente a CTM alogénicas derivadas de médula ósea (CTM-MO).
3. Analizar los mecanismos de protección y reparación cerebral por los que la administración por vía hemática de CTM-MO y CTM-TA alogénicas podrían favorecer la recuperación funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los modelos experimentales se realizaron con la autorización y siguiendo las recomendaciones del Comité de Experimentación Animal de este hospital según la normativa establecida por el R.D 1201/2005 y la directiva europea 2010/63/UE. Siguiendo el principio de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento) se utilizó el menor número de animales teniendo en cuenta la minimización del sufrimiento.

1. EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS

Este estudio se desarrolló en el Laboratorio de Neurociencia y Cerebrovascular del Hospital Universitario La Paz, Instituto de Investigación IdiPAZ, utilizando las siguientes infraestructuras y recursos materiales.

En el laboratorio de cirugía experimental se utilizaron los siguientes equipos:

- Animalario: salas de animales, de lavado y almacén.
- Microscopio quirúrgico Leica M300 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania).
- Instrumental de macro y microcirugía de acero inoxidable (Lanbeck, Talexco, Madrid, España).
- Monitor de constantes (Monitor Omicron ALTEA RGB, Medical devices, Madrid, España), para el registro continuo de frecuencia cardíaca (FC), electrocardiograma (ECG) y presión arterial (PA) evaluando los valores de Presión Arterial sistólica (PAS), Presión Arterial diastólica (PAd) y Presión Arterial media (PAm) a través de un catéter colocado en la arteria femoral del animal.
- Termorregulador modelo RTC 1 (Cibertec, Madrid, España). Plataforma de emisión de calor servocontrolada mediante una sonda de medida de la temperatura rectal, sobre la que se colocó al animal, manteniendo una temperatura de 36,5°C \pm 0,5 predeterminada constante.
- Manta térmica (Gaymar, Orchard Park, NY, EE.UU).
- Equipo de determinación automática de gases en sangre arterial (Nova Biomedical, LA, EE.UU) para el análisis de pH, pO₂, pCO₂ y bicarbonato.

- Medidor de glucemia con tiras reactivas Lifescan mod. one touch II (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ, EE.UU).

- Rota-Rod (Ugo Basile, Comerio VA, Italia) para evaluar la coordinación motora de los animales.

- Balanza de precisión modelo SVA 120 (Gram, Barcelona, España).

- Centrífuga Kubota 2010 (Kubota Corporation, Japón), para extracción del plasma donde se determinarán las citocinas pro- inflamatorias (IL-6, TNF- alpha).

- Matriz acrílica para cerebro de rata de 1mm (Stoelting Europe, Dublin, Irlanda) y cuchillas, para cortar el cerebro en fresco de los animales.

En el laboratorio de cultivos celulares se utilizaron los siguientes equipos:

- Campanas de flujo laminar Faster Bio 48 (Cultek S.L.U., Madrid, España), centrífuga (Heraeus instruments, Hanau, Alemania), incubadores de CO₂ Galaxy (New Brunswick Scientific, Enfield, CT, EE.UU), baño termostático (Raypa, Barcelona, España), pipeteadores (Accu-jet Brand, Wertheim, Alemania), bombas de aspiración.

- Microscopio óptico invertido (Nikon Corporation, Tokio, Japón). Se utilizó para la obtención, aislamiento y crecimiento de las CTM.

En el laboratorio de citometría se utilizó:

- Citómetro de Flujo FACScalibur (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU) y su programa CELLquest, para la caracterización de las CTM.

En el laboratorio de inmunohistoquímica y biología molecular se utilizaron los siguientes equipos:

- Nevera combi Bosch y congelador de -80°C Nuaire (Nirco, Madrid, España), para el almacenamiento de muestras.

- Criostato LEICA CM1950 (Leica Microsystems Heidelberg, Alemania), para cortar los cerebros congelados incluidos en OCT (Tissue-Teck, Sakura Finetek, CA, EE.UU) a un grosor de 10µm.

- Lector de placas Synergy 4 (Biotek, Winooski, VT, EE.UU), para la determinación de las citocinas pro-inflamatorias en plasma y cuantificación de proteína en tejido.

- Material para Western blot (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU), para la cuantificación de proteínas en el tejido cerebral.
- Máquina de revelado Curix 60 (Agfa-Gevaert, Morstel, Bélgica).
- Microscopio óptico Olympus, BX41 (Olympus Corporation, Tokio, Japón). Nos permitió observar las muestras de cortes histológicos.
- Microscopio confocal LEICA TCS SPE (Leica Microsystems Heidelberg, Alemania) y programa de análisis LEICA software LAS AF, version 2.0.1 Build 2043, para el estudio por inmunofluorescencia de los cortes de cerebro.

Equipos y material informático:

- Escáner Epson Perfection 1260 (Epson, Long Beach, CA, EE.UU), para la digitalización de los cortes histológicos.
- Programas informáticos Image J 1.42 (NIH software, Bethesda, MD, EE.UU) e Image-Pro Plus 4.1 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EE.UU). Nos permitió obtener una medida automatizada del tamaño de la lesión.
- Programas informáticos Scion Image y 1-D Manager version 2.1 (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EE.UU), para capturar, analizar y cuantificar geles 1D.

Por último, se contó con la colaboración del Servicio de Imagen y Espectroscopia por Resonancia Magnética de Alto Campo (SIERMAC), dirigido por el Dr. Sebastián Cerdán, donde se llevaron a cabo los estudios de imagen por Resonancia Magnética (RM) (Bruker Pharmascan, Ettlingen, Alemania 7 Tesla horizontal bore magnets) usando mapas T2 (RARE 8 T2, 180° ángulo de giro, 3 medias).

2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trató de un estudio experimental caso-control de IC por oclusión permanente de la arteria cerebral media (OpACM) en ratas. Basados en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se estimó que para un nivel de significación del 5% (alfa) y una

potencia del 8% (1-beta) eran necesarios 10 animales por grupo para detectar diferencias significativas en las variables de estudio.

Se seleccionó el modelo animal de OpACM tras craneotomía por presentar escasa variabilidad en el tamaño de lesión y reducida mortalidad. El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo mediante una pequeña craneotomía sobre la región de ACM, la cual se liga con una sutura de 9/0 justo antes de la bifurcación entre la rama frontal y parietal con el fin de conseguir una lesión cortical^{49,50}. Seguidamente se produce una oclusión transitoria con una sutura de 6/0 de las dos arterias carótidas comunes durante 1h.

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CTM

3.1. Aislamiento de CTM-MO

Para la obtención de las CTM-MO se utilizaron ratas adultas Sprague- Dawley (Harlan Iberica SL, Barcelona, España) entre 250-300g de peso. Tras sacrificar a los animales con una inyección cardiaca de cloruro potásico (0,5ml) se aislaron las tibias y los fémures en alcohol durante 10min y después se hizo un lavado en una solución salina de Hank (HBSS, Gibco, Paisley, Reino Unido) con Ca^{2+} y Mg^{2+} durante 30min. Tras cortar la epífisis de los huesos en condiciones estériles, dentro de una cabina de flujo laminar, se extrajo la médula ósea mediante un lavado con medio de Eagle modificado por Dulbecco (1X) (DMEM Glu/Pyr, Gibco) con 1% de antibiótico Penicillina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU) y 20% Suero Fetal Bovino (Laboratorios PAA GmbH, Pasching, Austria) para cada hueso. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 1.750 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 8min, sembradas en frascos de cultivo de 75cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca) e incubadas a una temperatura de 37°C, y en una atmósfera húmeda que contenía el 95% de oxígeno y el 5% de CO₂. A las 48-72h de incubación, se retiró el sobrenadante seleccionando las células adherentes al plástico. Las CTM-MO mostraron una morfología fibroblastoide observada mediante microscopía óptica

invertida. Cuando las células alcanzaron el 80-90% de confluencia se levantaron del frasco de cultivo con Trypsin- EDTA 0,05% (Gibco) y se expandieron a otro frasco de cultivo de 75cm². El medio de cultivo se fue cambiando cada 3 días. Las CTM-MO se sometieron a un máximo de tres pases *in vitro* con el fin de conservar el fenotipo de éstas como indicador de idoneidad para su administración. Al 3^{er} pase, las células fueron tripsinizadas y se realizó un recuento celular en la cámara de Neubauer. Para observar la viabilidad celular del cultivo se utilizó el método azul tripán al 0,05%, que permite diferenciar entre células viables/ brillantes frente a las teñidas de azul/ no viables. Posteriormente, las CTM-MO fueron contadas y marcadas para ser administradas a los animales a una dosis de 2x10⁶ células por animal.

3.2. Aislamiento de CTM-TA

Para la obtención de las CTM-TA de la grasa inguinal o abdominal se utilizaron ratas adultas Sprague- Dawley entre 250-300g de peso. La grasa fue lavada un par de veces en tampón fosfato salino (PBS) para eliminar la sangre y fue cortada con un bisturí para obtener trozos más pequeños y posteriormente, se digirió enzimáticamente con colagenasa. Se recogió la interfase entre la grasa y el debrís celular, siendo la población celular remanente obtenida la denominada como Fracción Estromal Vascular. Estas células contienen CTM-TA, las cuales fueron sembradas a 25.000 células/cm² en frascos de cultivo. Las células que no fueron adheridas al plástico se retiraron mediante una aspiración del medio de cultivo y se añadió medio nuevo, para que las células adheridas pudieran crecer. Estas células se fueron replicando y cuando alcanzaron una confluencia de 80-90%, fueron subcultivadas a una densidad de 1.000 células/cm².

Las CTM-TA mostraron una morfología fibroblastoide observada mediante microscopía óptica invertida. El medio de cultivo se fue cambiando cada 3 días. Las CTM-TA se sometieron a un máximo de tres pases *in vitro* con el fin de conservar el fenotipo de éstas como indicador de idoneidad para su administración. Al 3^{er} pase, las

células fueron tripsinizadas y se realizó un recuento celular en la cámara de Neubauer. Posteriormente, las CTM-TA fueron contadas y marcadas para ser administradas a los animales a una dosis de 2×10^6 células por animal.

3.3. Caracterización de CTM

La caracterización de CTM se llevó a cabo por la técnica de citometría de flujo. Se utilizaron como marcadores positivos CD90-FITC (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido) y CD29-PE (AbD Serotec) y como marcadores negativos, CD45-PE (AbD Serotec) y CD11b-PE (AbD Serotec) e isotipos (Biolegend, San Diego, CA, EE.UU) como controles. Las CTM se incubaron con los anteriores anticuerpos durante 20min a 4°C en oscuridad y posteriormente, se lavaron las células con PBS 1x (1.750 rpm durante 8min) y resuspendidas en 200ul de PBS 1x para su posterior lectura del inmunofenotipo en el citómetro de flujo (FacsCalibur, BD Biosciences, San José, CA, EE.UU). Al menos, 1×10^4 células fueron adquiridas y analizadas por muestra.

4. SUJETOS A ESTUDIO

Se estudiaron 70 ratas macho adultas Sprague-Dawley (Harlan Iberica S.L.) que fueron criadas en el animalario del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, hasta que alcanzaron 250-320g. Los animales fueron estabulados con libre acceso a alimento y agua, a temperatura ambiente de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa $45 \pm 15\%$ y ciclo de luz de 12h (de 7 de la mañana a 7 de la tarde).

Los animales se distribuyeron en 7 grupos con un total de 10 animales por grupo (Tabla 2).

1. **Grupo sham i.v.:** las ratas fueron sometidas a todo el procedimiento quirúrgico a excepción de la isquemia cerebral. Se administró suero salino por vía i.v.
2. **Grupo sham i.c.:** las ratas fueron sometidas a todo el procedimiento quirúrgico a excepción de la isquemia cerebral. Se administró suero salino por vía i.c.

3. **Grupo control i.v.:** isquemia cerebral con OpACM y oclusión transitoria de arterias carótidas comunes (ACC) durante 60min y a los 30min después se administró suero salino por vía i.v.
4. **Grupo control i.c.:** isquemia cerebral con OpACM y oclusión transitoria de ACC durante 60min y a los 30min después se administró suero salino por vía i.c.
5. **Grupo CTM-MO i.v.:** isquemia cerebral con OpACM y oclusión transitoria de ACC durante 60min y a los 30min después se administraron las CTM-MO por vía i.v.
6. **Grupo CTM-MO i.c.:** isquemia cerebral con OpACM y oclusión transitoria de ACC durante 60min y a los 30min después se administraron las CTM-MO por vía i.c.
7. **Grupo CTM-TA i.v.:** isquemia cerebral con OpACM y oclusión transitoria de ACC durante 60min y a los 30min después se administraron las CTM-TA por vía i.v.

Tabla 2. Esquema de los grupos de estudio y tratamiento. Los animales se distribuyeron en 7 grupos con 10 animales por grupo.

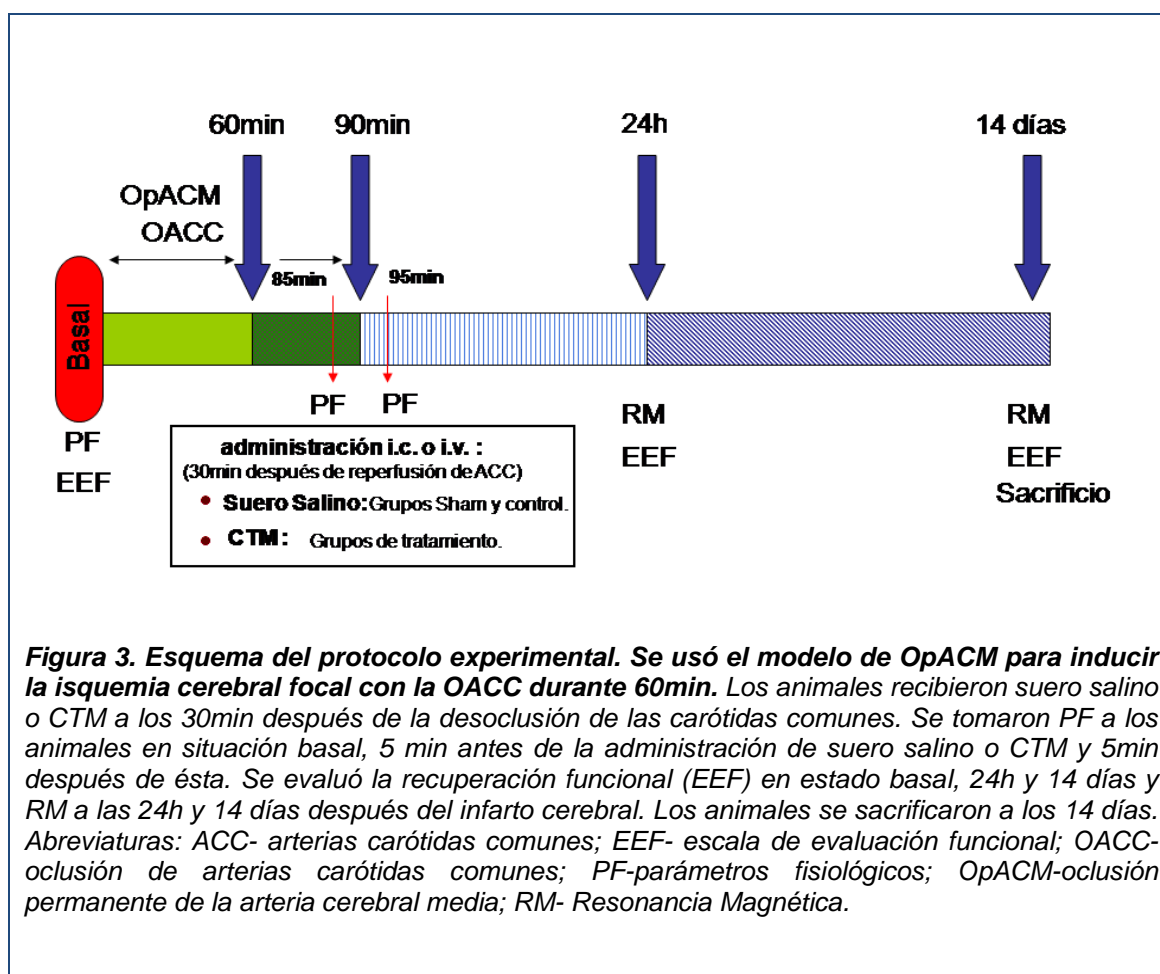
Grupo	Isquemia	Tratamiento	Dosis
Sham i.v.	-	Suero Salino	0,65 ml
Sham i.c.	-	Suero Salino	0,65 ml
Control i.v.	+	Suero Salino	0,65 ml
Control i.c.	+	Suero Salino	0,65 ml
CTM-MO i.v.	+	CTM-MO	2×10^6 células/0,65 ml
CTM-MO i.c.	+	CTM-MO	2×10^6 células/0,65 ml
CTM-TA i.v.	+	CTM-TA	2×10^6 células/0,65 ml

Todos los animales fueron anestesiados como se describirá en el apartado 4.1. Durante todo el procedimiento experimental se mantuvo constante la temperatura

corporal ($36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$) y la arteria femoral fue canulada para monitorizar la PA, FC, glucemia y gasometría arterial.

Los animales de los grupos sham y control recibieron, en lugar de las CTM, un volumen equivalente de suero salino con la misma pauta de administración.

Una vez finalizado el procedimiento se extrajeron los catéteres, se cerraron las heridas quirúrgicas de la arteria y vena femoral y de la arteria carótida externa (ACE). Después de 14 días de supervivencia los animales fueron anestesiados de nuevo para su sacrificio. Los detalles del procedimiento experimental se esquematizan en la gráfica de la Figura 3.



4.1. Inducción de anestesia y analgesia para procedimiento quirúrgico

Se indujo anestesia por vía i.p. mediante una solución compuesta por:

- Ketamina sol. (Ketolar®50. Parke-Davis S.L., Madrid, España). Vial de 50 mg/ml; anestésico general de acción rápida conservando el reflejo faríngeo-laríngeo y estímulo cardiorrespiratorio.
- Diazepam sol. (Valium®10. Roche Farma S.A., Madrid, España). Ampolla de 5mg/ml con efecto tranquilizante, sedante, relajante muscular y anticonvulsionante.
- Atropina sol. (Atropina sulfato Braun®. Braun Medical S.A., Barcelona, España). Vial de 1mg/ml para suprimir la salivación, las secreciones de vías respiratorias y relaja el músculo liso bronquial produciendo broncodilatación, lo que ayuda a evitar complicaciones respiratorias durante la anestesia.

La dosis de inducción de anestesia fue de 2,5ml/kg por vía i.p, administrando 0,2 ml adicionales cada vez que era necesario. Todos los animales recibieron al inicio de la cirugía 2mg/kg de meloxicam por vía i.p. con el fin de reducir el estrés producido por el dolor en las primeras 24h.

4.2. Monitorización de parámetros fisiológicos

Para la monitorización de los parámetros fisiológicos (glucemia, gasometría arterial y PA) se canuló la arteria femoral derecha (Monitor Omicron ALTEA RGB medical devices, Madrid, España) y para la temperatura corporal se utilizó una sonda rectal. Estos parámetros podrían influir en la extensión de la lesión cerebral⁸⁶ y, por tanto, modificar los resultados del experimento, por lo que se procura mantener en límites normales:

- Temperatura corporal ($36,5^{\circ}\pm 0,5$) medida con una sonda rectal, se registra durante todo el procedimiento experimental. La temperatura se mantuvo constante

gracias a la mesa generadora de calor, pero si en algún momento desciende la temperatura, se añade otra fuente de calor mediante una bombilla de 220v.

- Glucemia. Se determinó mediante tiras reactivas con una gota de sangre arterial procedente de arteria femoral. Se realizaron determinaciones en situación basal, a los 5 min antes de la administración de suero salino o CTM y 5min después de éstas.

- Gasometría arterial. Se determinó pH, pO₂, pCO₂ y bicarbonato en 0,3ml de sangre arterial procedente de arteria femoral. Se realizaron determinaciones en situación basal y a los 5min después de la administración de suero salino o CTM. El volumen de sangre extraída se repuso con un volumen equivalente de suero salino.

- Presión arterial. Se controlaron PAs, PAm y PAd durante todo el procedimiento a través de un catéter colocado en la arteria femoral.

4.3. Descripción del sistema carotídeo de la rata

Tras separar el músculo esternocleidomastoideo y el músculo omohioideo, queda al descubierto el paquete vasculonervioso del cuello. Siguiendo ACC en sentido rostral se identifican la bifurcación carotídea y ACE y sus ramas, una de trayecto posterior, la arteria occipital, y otra de trayecto medial, arteria tiroidea. En ocasiones queda visible una tercera rama de ACE, una arteria laríngea, de trayecto medial. La arteria carótida interna (ACI) se localiza en posición posteromedial con respecto a ACE y, por detrás del asa del hipogloso, a menos de 1cm de la bifurcación, se divide en dos ramas. Una más anterior y medial es la ACI propiamente dicha. La otra, más posterior y lateral, se denomina arteria pterigopalatina. La ACI se introduce en el cráneo por el agujero carotídeo. Por delante de la región hipotálamo- hipofisaria, lateral al quiasma óptico, se divide en ACM y arteria comunicante anterior (ACA). La ACM se dirige lateralmente cruzando el surco y el tracto olfatorio hacia la convexidad donde se divide en sus dos ramas principales. La ACA se dirige hacia las regiones más rostrales del cerebro paralela al tracto olfatorio. El FSC regional en el hemisferio cerebral depende fundamentalmente de ACM. Existe una importante red de suplencia con el sistema

carotídeo contralateral y con el sistema vertebrobasilar a través del polígono de Willis, mediante arterias comunicantes anterior y posterior de gran calibre, y también a través de arterias cortico-meníngicas (Figura 4)⁸⁷.

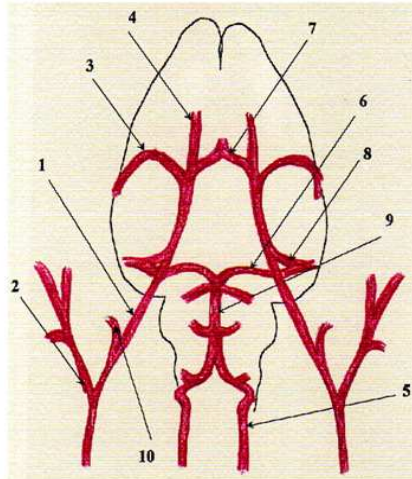


Figura 4. Representación esquemática de las principales arterias del sistema carotídeo y vertebrobasilar de la rata. 1. ACI; 2. ACE; 3. ACM; 4. ACA; 5.A. Vertebral; 6.ACP; 7.A.Comunicante Anterior; 8.A. Comunicante Posterior; 9.A. Basilar; 10.A. Pterigopalatina⁸⁷.

4.4. Administración de CTM

Para la administración i.c. de CTM se ligaron, la ACE, la arteria superior tiroidea y la pterigopalatina con suturas de 6-0 tras exposición de la arteria carótida ipsilateral. La dosis empleada de CTM fue de 2×10^6 células en 650 μ l de suero salino/4min. Estas células fueron inyectadas en la ACI a través de un catéter localizado en ACE. Para la administración i.v., se administraron 2×10^6 CTM en 650 μ l de suero salino/4min a través de la vena femoral.

Los animales control (sometidos a isquemia cerebral) y sham (no sometidos a isquemia cerebral), recibieron una sola inyección de 650 μ l de suero salino en 4min a través de la vena femoral o de la ACI.

4.5. Sacrificio del animal

Los animales fueron sacrificados tras 14 días de supervivencia después de la cirugía. Para ello, los animales fueron anestesiados con sevoflurano (Sevorane®,

Laboratorios Abbott, Illinois, EE.UU) al 8% y decapitados en la guillotina. El cerebro en fresco fue colocado en una matriz acrílica y se realizaron cortes de 2mm desde el quiasma óptico hasta el tallo infundibular. Parte de ese tejido fue introducido en nitrógeno líquido para su posterior congelación a -80°C y otra parte fue utilizado para estudios histológicos.

4.6. Procesado para estudio histológico

La parte central del cerebro de cada animal se introdujo en paraformaldehído al 4% durante 24h y posteriormente, en una solución de sacarosa al 30% preparada con tampón fosfato 0.1 M, pH 7.3 durante 72h a 4°C. Los cerebros crioprotegidos se embebieron en cassettes con una resina de congelación OCT (Tissue-Teck, Sakura Finetek, CA, EE.UU) y se congelaron a -80°C. Para cortar el tejido, primero se colocaron sobre un soporte de criostato en nieve carbónica durante 10min hasta su total congelación. Los cerebros se seccionaron en cortes de 10µm de grosor con un criostato para realizar los diversos estudios histológicos. Los cortes de cerebro se colocaron sobre portaobjetos tratados con silano (Sigma-Aldrich) para facilitar su adhesión.

5. VARIABLES DE ESTUDIO

Para evaluar la efectividad de las diferentes rutas de administración, i.c. e i.v. de CTM-MO, se analizaron las siguientes variables de estudio: evaluación funcional, implantación de CTM en la zona de la lesión, tamaño de la lesión, muerte celular, proliferación celular, niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias, expresión de Lectina y VEGF y co-marcajes de Dil.

Al analizar los distintos tipos celulares, CTM-MO y CTM-TA por vía i.v., se estudiaron las siguientes variables: evaluación funcional, tamaño de la lesión, muerte celular,

proliferación celular, niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias y expresión de marcadores de reparación cerebral.

5.1. Escalas de evaluación funcional

El déficit motor se cuantificó mediante la escala funcional descrita por Rogers y cols^{88,89}. Se realizó una evaluación funcional por un investigador ciego en situación basal, 24h y 14 días después del IC. De acuerdo con este test los animales recibieron una puntuación según una escala que se basa en un comportamiento motor cuyos valores van de 0 a 7:

- 0: sin déficit funcional.
- 1: limitación de movilidad en la pata izquierda delantera.
- 2: incapacidad de agarre con la pata izquierda delantera al sujetar al animal por la cola.
- 3: movimiento espontáneo en todas direcciones, con giro hacia el lado contralateral a la lesión al sujetar al animal por la cola.
- 4: movimiento espontáneo en círculo hacia el lado de la lesión.
- 5: movimiento sólo tras estímulo.
- 6: bajo nivel de conciencia o falta de respuesta a estímulo.
- 7: muerte.

Además, para comparar la eficacia de los diferentes tipos celulares de CTM por vía i.v., se evaluó también la coordinación motora mediante el test de Rota-Rod (Ugo Basile) que registra el tiempo que tarda en caer el animal. Todos los animales recibieron un entrenamiento previo los tres días anteriores al IC (3 sesiones/día) durante 2min con una aceleración de 4-40 r.p.m. Se calculó el tiempo que se mantiene el animal en el rodillo giratorio. Los valores fueron calculados como la media de las dos pruebas durante los diferentes periodos de tiempo⁹⁰.

5.2. Evaluación de la implantación de CTM analizado por RM e inmunofluorescencia

En 5 animales de cada grupo de tratamiento se marcaron las CTM antes de su administración con un agente de hierro (superparamagnetic iron oxide, SPIO) asociado con dextrano que es usado como medio de contraste en RM sin modificar las características naturales de las células. Se incubaron con solución de marcaje consistente en 50µl/ml de Endorem™ (Guerbet, Roissy CdG Cedex, Francia) en DMEM y 6mg/ml de sulfato de protamina, utilizando éste como agente transfectante para favorecer la internalización de las partículas de hierro por parte de las células en cultivo⁹¹. Tras un período de incubación de 12h a 37°C, los pocillos fueron lavados con PBS y heparina para eliminar los restos de marcaje que no hubieran penetrado en el interior celular. La implantación fue analizada a las 24h y 14 días por RM con mapas T2 (secuencia Flash).

Por otra parte, en 5 animales de cada grupo de tratamiento, las CTM fueron marcadas con un trazador lipofílico de membrana llamado Dil labeling (Celltracker CM-Dil, Molecular Probes™, Eugene, Oregon, EE.UU) antes de su administración. Para ello, este marcador se resuspendió en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 1mg/ml. Las células fueron marcadas e incubadas en medio Hanks (1X) (HBSS, Gibco) durante 10min a 37°C y luego durante 30min a 4°C. Después, las células se lavaron 3 veces en PBS y se resuspendieron en salino para ser administradas a los animales. La implantación de CTM fue analizada a los 14 días después del IC por inmunofluorescencia. Su fluorescencia de excitación es de 553nm y su máxima emisión es de 570nm.

5.3. Tamaño de lesión analizado por RM

El tamaño de lesión se analizó a las 24h y 14 días después del IC por RM (Bruker Pharmascan, Ettlingen, Alemania 7 Tesla horizontal bore magnets) usando mapas T2 (RARE 8 T2, 180° ángulo de giro, 3 medias) (Figura 5). Se procesaron 10 cortes

coronales continuos de un grosor de 1mm en un campo de visión de 35x35mm y un tamaño de matriz de 256x256 (tiempo de repetición (TR) 3.000 ms, tiempo de eco (TE) 29,5ms, tiempo de imagen 25,5min, 3 medias). Las imágenes se procesaron con el programa Image J 1.42 program (NIH software, Bethesda, MD, EE.UU).

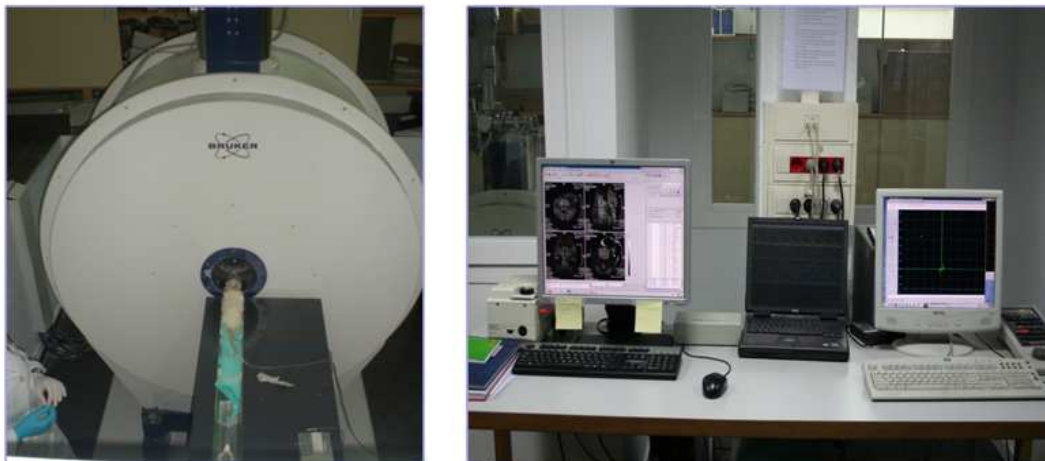


Figura 5. Resonancia magnética Bruker Pharmascan Germany 7 Teslas del SIERMAC y procesamiento de análisis de imagen.

El tamaño de la lesión se expresó como porcentaje según la fórmula: tamaño de la lesión / tamaño del hemisferio ipsilateral intacto x100.

5.4. Tamaño de lesión analizado por H&E

Además, el tamaño de la lesión fue medido en cortes histológicos de 10µm de grosor teñidos con H&E a los 14 días^{50,88}. Para ello, las muestras se hidrataron en agua y posteriormente, se tiñeron con hematoxilina de Harris (3-4 pases) viéndose de color azul los ácidos nucleicos (núcleo), cargados negativamente. A continuación, las muestras se lavaron en agua y se introdujeron en la solución de eosina-floxina (4min) donde el citoplasma y los compuestos acidófilos se tiñeron de rosa. Las muestras se deshidrataron en soluciones de alcohol crecientes y se montaron en DePeX para su observación en microscopía óptica. En los cortes teñidos con H&E la zona del infarto se identificó como un área pálida delimitada del resto de tejido. Se seleccionaron el corte número 20 de cada animal para medir el tamaño de la lesión. Se obtuvo de cada

corte una imagen digitalizada mediante escáner sobre la que se identificó la zona del IC y la zona sana del hemisferio infartado que fueron delimitadas para obtener de manera automática la medida de las superficies correspondientes a través de un programa informático Image-J 1.42 program (NIH software). El tamaño del infarto fue expresado como en el apartado 5.3.

5.5. Inmunohistoquímica

Se realizaron estudios de inmunohistoquímica para determinar la muerte celular y la proliferación celular en la zona de peri-infarto a los 14 días después de la lesión.

5.5.1. Muerte celular

La muerte celular se cuantificó por el método TUNEL (*in situ* end- labeling of nuclear DNA fragmentation)⁹², técnica inmunohistoquímica que consiste en la adición de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP), marcados con biotina, a los extremos 3'-OH de los fragmentos del ADN formados, a través de la reacción catalizada por el enzima deoxirribonucleotidil transferasa terminal. Esta técnica permite determinar la presencia de fragmentos de ADN en células individuales aunque no distingue ADN fragmentado en células muertas por apoptosis o necrosis si no se siguen criterios morfológicos. Se utilizó un kit comercial y se siguieron las instrucciones del proveedor (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- FragEL DNA fragmentation detection kit, Oncogene Research Products, San Diego, CA, EE.UU). Las muestras se rehidrataron y permeabilizaron con proteinasa K (30min) a temperatura ambiente para permeabilizar las membranas. Se inactivó la peroxidasa endógena con 10% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂, al 30%) en metanol (5min) y a continuación, se llevó a cabo la reacción de equilibración (Tris 0,15M y 1,5mg/ml de albúmina de suero bovina (BSA)). Transcurridos 30min, se incubaron las muestras con TdT y mezcla de marcaje, que incluyó los dNTP biotinilados (dilución 1:20), a 37°C durante 1h.

Terminada la reacción de marcaje con el tampón de parada (0,5 M EDTA, pH 8), las muestras se bloquearon (BSA al 4% en tampón fosfato) e incubaron con el complejo estreptavidina-peroxidasa en tampón de bloqueo (dilución 1:25). Finalmente, se visualizó la reacción colorimétrica con diaminobenzidina (DAB, Life Technologies S.A., Madrid, España) y H_2O_2 . El DAB reaccionó con las muestras marcadas con peroxidasa dando un sustrato insoluble y coloreado en el lugar donde se produce la fragmentación del ADN. La contratinción se realizó con verde metilo para visualizar las células TUNEL negativas. Para los controles negativos las muestras se incubaron sin enzima. Los lavados de las muestras se realizaron con tampón tris salino (20mM Tris pH 7,6, 140mM NaCl). Finalmente, las muestras se deshidrataron hasta xilol y se montaron con un cubreobjetos. Se cuantificaron a 400X con un microscopio (Olympus, BX41, Olympus Corporation, Tokio, Japón) en un programa de análisis de imagen (Image-Pro Plus 4.1, Media Cybernetics, Rockville, MD, EE.UU). Para el conteo de células TUNEL positivas, se seleccionó el mismo corte de cerebro en todos los animales (corte número 21) siendo identificadas por la morfología de sus núcleos y por el color marrón oscuro⁸⁸.

5.5.2. Proliferación celular

A todos los animales se les administró 50mg/kg de BrdU (Sigma-Aldrich) i.p. diariamente entre los días 4 y 7 después de la isquemia cerebral.

Las secciones coronales cortadas a 10µm fueron tratadas con el kit BrdU *In-Situ* Detection (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU) para estudiar la proliferación celular en la zona de peri-infarto. Para ello, las secciones congeladas se fijaron con el buffer de fijación durante 15min y se incubaron con H_2O_2 al 0,3% en PBS para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un tratamiento de desenmascaramiento antigénico con una olla a presión durante 15min a 90°C y se incubaron con el anticuerpo biotinilado anti-BrdU (anticuerpo monoclonal diluido 1:100) durante 1h en la cámara húmeda a temperatura

ambiente. Transcurrido este tiempo, se incubaron durante 30min con estreptavidina-peroxidasa y se revelaron con DAB. La contratinción se realizó con Hematoxilina para visualizar las células BrdU negativas. Para los controles negativos las muestras se incubaron sin enzima.

Las muestras se hidrataron y se montaron en un porta y finalmente se cuantificaron a 400X con un microscopio óptico (Olympus BX41) en un programa de análisis de imagen (Image-Pro Plus 4.1). Para el conteo de células BrdU positivas identificadas por el color marrón oscuro se seleccionó el mismo corte de cerebro en todos los animales (corte número 22).

5.6. Determinación de citocinas pro-inflamatorias: TNF-alpha e IL-6

Se determinaron los niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias TNF-alpha e IL-6 mediante ELISA (Bender Medsystems, Viena, Austria). Las muestras de sangre se obtuvieron a los 14 días y se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15min, se extrajo el plasma y se almacenó a -80°C hasta el procesamiento. La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto puede ser medido. La placa de ELISA consta de 96 pocillos tratados para aumentar su capacidad de absorción de moléculas y con fondos de pocillo óptimamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en lectores.

Las 4 fases de un ensayo de ELISA son las siguientes:

- 1- Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima (peroxidasa).
- 2- Unión del antígeno o del anticuerpo a los pocillos, esta unión se realiza con facilidad a la superficie de plástico tratada que tiene gran afinidad por proteínas.
- 3- Formación de una o más capas de inmunocomplejos.
- 4- Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato

enzimático en solución. Se dejó reaccionar y se leyó la densidad óptica en un lector de ELISA. Cada experimento se realizó por duplicado, por lo que el resultado final se obtuvo de la media de las determinaciones. Los resultados se expresaron en pg/mL. Los niveles mínimos de detección para TNF- α fueron de 11pg/mL y para IL-6 de 19pg/mL.

5.7. Inmunofluorescencia

Mediante esta técnica se determinó la expresión de diferentes proteínas en la zona de peri-infarto mediante microscopía confocal a los 14 días después de la lesión.

Secciones coronales de 10 μ m de grosor fueron teñidas usando marcadores neuronales: NeuN (anticuerpo monoclonal diluido 1:100, Millipore, Billerica, MA, EE.UU) y neurofilamento (NF) (anticuerpo monoclonal diluido 1:100, DAKO, Dinamarca A/S, Glostrup, Dinamarca); marcador de astrocitos de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (anticuerpo monoclonal diluido 1:400, Chemicon, Temecula, CA, EE.UU); marcador de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (anticuerpo policlonal diluido 1:500, Millipore), marcador de sinaptogénesis SYP (anticuerpo monoclonal diluido 1:200, Sigma-Aldrich), marcador de oligodendrocitos olig-2 (anticuerpo policlonal diluido 1:500, Millipore), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (anticuerpo policlonal diluido 1:1000, Millipore) y marcador de macrófagos y microglía CD11 b/c (anticuerpo monoclonal diluido 1:300, BD Biosciences) seguidos de goat anti-mouse Alexa Fluor 488 y anti-rabbit Alexa Fluor 594 (1:750, Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, España). Además, se usó el marcador de proliferación anti-BrdU (anticuerpo monoclonal diluido 1:50, DAKO) seguido de goat anti-mouse Alexa Fluor 594 y el marcador endotelial Isolectina B4 (anticuerpo diluido 1:50, Sigma-Aldrich) seguido de estreptavidina Alexa Fluor 488 (anticuerpo diluido 1:1000, Molecular Probes). Todas las muestras fueron montadas con un medio para fluorescencia con 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) (H-1200 VectaShield, Vector, Atom, Alicante, España) para observar los núcleos celulares teñidos de azul.

Las muestras fueron examinadas con el microscopio confocal LEICA TCS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) usando el programa LAS AF, version 2.0.1 Build 2043 (Leica). Las imágenes fueron adquiridas con la máxima proyección y los co-marcajes de algunas imágenes fueron llevadas a cabo con el módulo de colocación de LEICA, LAS AF, version 2.0.1 Build 2043.

5.8. Análisis de proteínas del tejido cerebral

Se realizaron estudios de expresión de proteínas de VEGF, GFAP, SYP, Olig-2, NF y BDNF en la zona de peri-infarto a los 14 días después del IC entre ambos tipos celulares. Para ello se cuantificó mediante Western-Blot la concentración de proteínas existentes en el tejido en fresco.

5.8.1. Cuantificación de proteínas

El tejido fresco fue introducido en nitrógeno líquido para su posterior congelación a -80°C. La concentración de proteínas de las muestras se calculó mediante el método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL, EE.UU). Para calcular la concentración de proteínas, los valores de absorbancia de las muestras a 540 nm se interpolaron en una recta patrón realizada a partir de una solución de BSA (Sigma-Aldrich) con valores entre 0 y 2µg/µl de BSA. El color formado fue proporcional al contenido proteico de la muestra.

5.8.2. Western Blot

Se analizaron varias proteínas del tejido cerebral de la zona de peri-infarto por Western Blot. La cantidad de proteína empleada fue de 20µg, el porcentaje de acrilamida de los geles de separación fue del 10% y la concentración del anticuerpo primario se ajustó a las necesidades de cada proteína y a la eficacia del anticuerpo.

Se llevó a cabo la electroforesis SDS-PAGE a 100V durante 1h y posterior transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU) durante 1h. Las membranas se bloquearon en leche desnatada al 5% disueltas en tampón tris salino pH 8.0 (TBS) más 0,1% *tween*-20 (TBS-T)

durante 1h. Posteriormente, se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos: NF (anticuerpo monoclonal diluido 1:100, DAKO), BDNF (anticuerpo policlonal diluido 1:1000, Millipore), GFAP (anticuerpo monoclonal diluido 1:400, Chemicon), Olig-2 (anticuerpo policlonal diluido 1:500, Millipore), SYP (anticuerpo monoclonal diluido 1:200, Sigma-Aldrich), VEGF (anticuerpo policlonal diluido a 1:500, Millipore), β -tubulina (anticuerpo monoclonal diluido a 1:400, Sigma-Aldrich) y β -actina (anticuerpo monoclonal diluido a 1:400, Sigma-Aldrich). Esto 2 últimos fueron usados como controles de carga para normalizar los resultados. Después de lavarse con 0,5% TBS-T, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario, HRP (anti-mouse y anti-rabbit peroxidasa de rábano diluido a 1:10000 y 1:20000 respectivamente, Chemicon) durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, dichas membranas fueron lavadas con TBS-T y TBS y se revelaron con el sistema ECL (GE, Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania). Las bandas correspondientes a cada una de las proteínas estudiadas fueron cuantificadas mediante densitometría con los programas Scion Image y 1-D Manager version 2.1. (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EE.UU).

Para reducir las diferencias entre animales se realizaron tres Western-Blots por cada animal.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó con el asesoramiento de la Unidad de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz utilizando el paquete estadístico SPSS versión 16.0 para Windows. Los datos cuantitativos se presentaron como media \pm desviación estándar para comparar los parámetros fisiológicos, la escala de evaluación funcional mediante los test de Rogers y Rota-Rod, tamaño de lesión por RM y H&E, número de células TUNEL positivas y número de células BrdU positivas mediante inmunohistoquímica, niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias (TNF-alpha e IL-6) por ELISA,

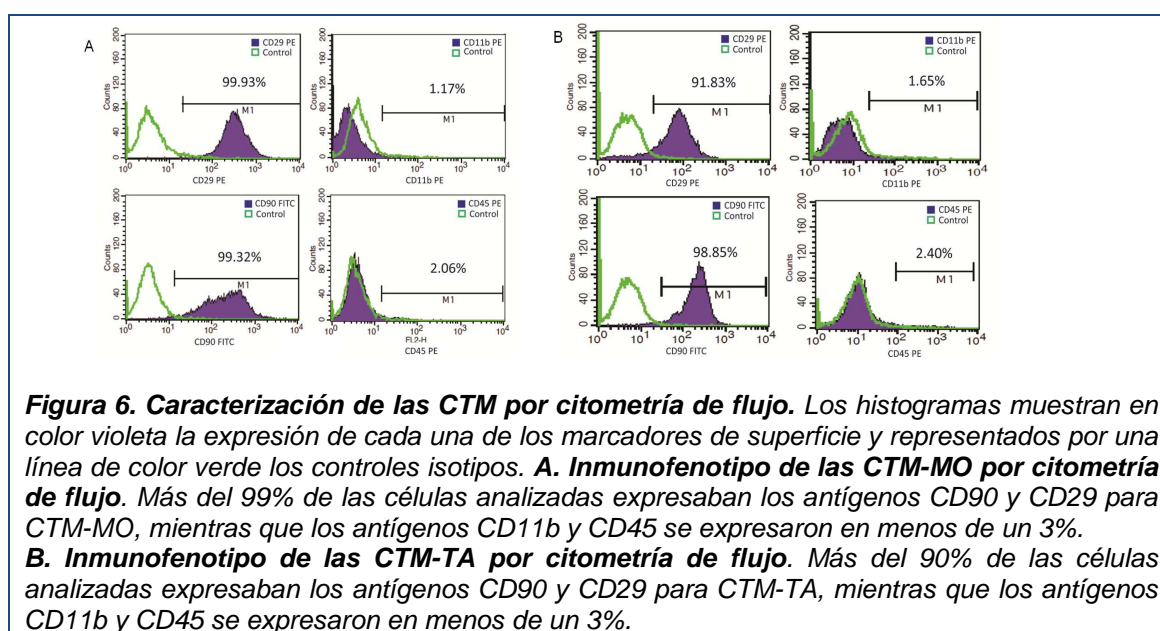
expresión de proteínas en el peri-infarto mediante inmunofluorescencia y Western Blot así como, el número de vasos sanguíneos por inmunofluorescencia, entre los diferentes grupos de estudio. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se utilizaron test no paramétricos (Kruskal-Wallis para detectar diferencias entre grupos y test de Mann-Whitney como test post-hoc para comparar los grupos dos a dos y conocer qué grupo de tratamiento fue diferente del control).

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 70 ratas macho adultas Sprague-Dawley (Harlan Iberica S.L.) de peso comprendido entre 250-320g.

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CTM

Las CTM presentaron una morfología esférica durante su división celular y conforme fueron creciendo en cultivo, aumentaron en tamaño, formando colonias en monocapa. Se expandieron en diferentes pases y se observó por microscopia óptica invertida la morfología fibroblastoide. La caracterización de CTM se llevó a cabo por citometría de flujo. Se confirmó que los marcadores CD90-FITC y CD29-PE fueron positivos para CTM mientras que los marcadores CD45-PE y CD11b-PE fueron negativos. Se aprecia en histogramas en color violeta la expresión de cada uno de los antígenos y representados por una línea de color verde los controles de isotipos. Más del 99% de las células analizadas expresaban los antígenos CD90 y CD29 para CTM-MO y más del 90% para CTM-TA, mientras que los antígenos CD11b y CD45 se expresaron en menos de un 3% en ambas fuentes celulares. Por tanto, las células troncales administradas presentaron un fenotipo mesenquimal $CD90^+$, $CD29^+$, $CD11b^-$, $CD45^-$ (Figura 6).



2. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

En todos los animales se analizaron los parámetros fisiológicos en situación basal, 5min antes de la administración de suero salino o CTM y 5min después de ésta, excepto el pH donde se tomaron los valores en situación basal y 5min después de la administración de suero salino o CTM. Los diferentes grupos de estudio no mostraron diferencias significativas entre los parámetros analizados. Durante todo el experimento, se mantuvo constante la temperatura corporal ($36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5$).

Al analizar la glucemia no se registró ningún incremento significativo de las cifras de glucosa en sangre tras la administración de las CTM (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de glucemia. Cifras de glucemia en mg/dl en cada grupo de estudio expresadas como media \pm desviación estándar.

Grupos	GLUCEMIA BASAL	GLUCEMIA 5MIN ANTES	GLUCEMIA 5MIN DESPUÉS
SHAM i.v.	93,4 \pm 13,01	147,33 \pm 11,24	130,67 \pm 21,59
SHAM i.c.	106,75 \pm 18,78	165,75 \pm 10,34	154,75 \pm 13,15
CONTROL i.v.	87 \pm 13,29	119,75 \pm 17,25	118,25 \pm 14,22
CONTROL i.c.	88,57 \pm 18,21	135 \pm 38,38	152,57 \pm 36,66
CTM-MO i.v.	75,5 \pm 11,84	123,5 \pm 36,02	127 \pm 28,57
CTM-MO i.c.	82 \pm 8,68	132,14 \pm 36,41	133,86 \pm 27,32
CTM-TA i.v.	87,25 \pm 6,08	130,25 \pm 21,31	135,25 \pm 19,57

Con respecto a la PA, los valores se mantuvieron estables y no se detectaron diferencias significativas entre los animales de los diferentes grupos (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de PAm. Cifras de PAm en mmHg en cada grupo de estudio expresadas como media \pm desviación estándar.

Grupos	PA BASAL	PA 5MIN ANTES	PA 5MIN DESPUÉS
SHAM i.v.	95,33 \pm 5,03	104,33 \pm 16,50	102,75 \pm 21,68
SHAM i.c.	85 \pm 12,73	88,75 \pm 8,30	98 \pm 10,95
CONTROL i.v.	81 \pm 1,41	102,75 \pm 21,68	100 \pm 24,56
CONTROL i.c.	97,57 \pm 18,85	115,33 \pm 9,158	123,29 \pm 9,03
CTM-MO i.v.	88,83 \pm 15,84	103,33 \pm 16,88	95 \pm 12,10
CTM-MO i.c.	95,29 \pm 15,96	109 \pm 11,75	112,14 \pm 10,61
CTM-TA i.v.	106,25 \pm 7,5	115,5 \pm 26,79	112,5 \pm 23,17

Por último, los valores del pH se mantuvieron estables a lo largo de todo el protocolo experimental y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos. (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de pH. Cifras de pH en cada grupo de estudio expresadas como media \pm desviación estándar.

Grupos	pH BASAL	pH 5MIN DESPUÉS
SHAM i.v.	7,31 \pm 0,03	7,31 \pm 0,06
SHAM i.c.	7,33 \pm 0,02	7,31 \pm 0,03
CONTROL i.v.	7,31 \pm 0,06	7,35 \pm 0,02
CONTROL i.c.	7,28 \pm 0,03	7,28 \pm 0,04
CTM-MO i.v.	7,30 \pm 0,04	7,33 \pm 0,02
CTM-MO i.c.	7,28 \pm 0,02	7,31 \pm 0,03
CTM-TA i.v.	7,31 \pm 0,03	7,3 \pm 0,01

3. VARIABLES DE ESTUDIO ENTRE DIFERENTES RUTAS DE ADMINISTRACIÓN HEMÁTICA DE CTM-MO

3.1. Evaluación funcional

Se llevó a cabo una evaluación funcional mediante la escala de Rogers en todos los animales a las 24h y a los 14 días después de la isquemia cerebral.

Todos los animales presentaron una puntuación de 0 en condiciones basales, lo que significa no déficit funcional. En el grupo sham todos los animales obtuvieron una puntuación de 0 en todas las evaluaciones. Los grupos control, independientemente de la vía de administración, mostraron mayor déficit funcional en la escala de evaluación tanto a las 24h como a los 14 días sin mostrar diferencias significativas entre ambos grupos. Los animales tratados, independientemente de la ruta, mostraron una buena recuperación funcional a las 24h y a los 14 días sin diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 7).

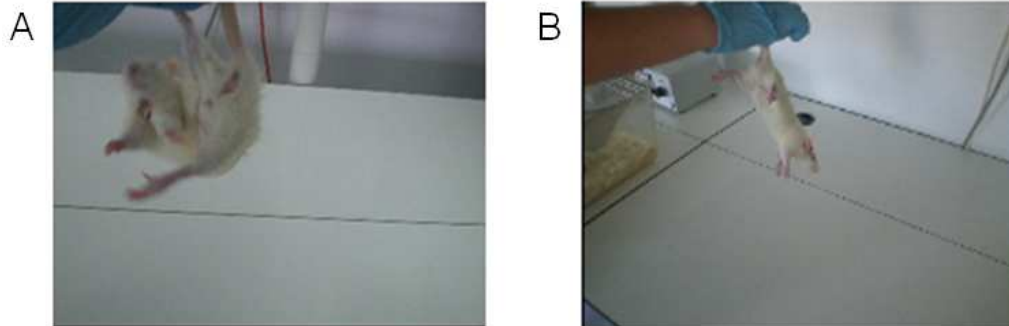
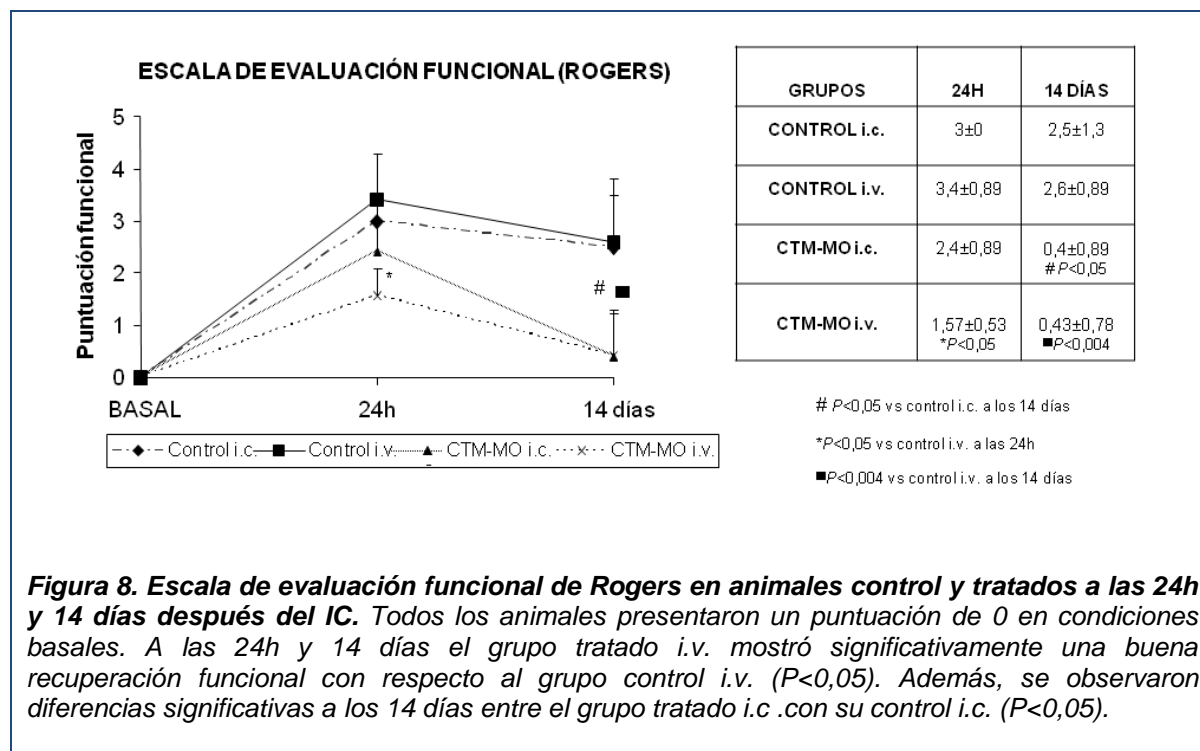


Figura 7. A. Imagen de un animal control sometido al test de Rogers. Éste presentaba hemiparesia después del IC y al cogerle de la cola, giraba constantemente hacia el lado contralateral de la lesión. B. Imagen de un animal tratado sometido al test de Rogers. El animal no presentaba hemiparesia después del IC y al cogerle de la cola, permanecía en posición vertical, con patas estiradas.

Al comparar entre rutas de administración, a las 24h se observó que entre el grupo control i.v. ($3,4 \pm 0,89$) y el grupo CTM-MO i.v. ($1,57 \pm 0,53$) hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) y esta respuesta continuó al menos hasta los 14 días ($P < 0,004$) después del IC.

También, se mostraron diferencias significativas entre el grupo control i.c. ($2,5 \pm 1,3$) y CTM-MO i.c. ($0,4 \pm 0,89$) hasta los 14 días ($P < 0,05$) (Figura 8).



3.2. Implantación de CTM-MO identificadas por RM e inmunofluorescencia

Se analizó la implantación de CTM-MO por RM a las 24h y 14 días (Figura 9). En los grupos control al no existir administración de células no se observó implantación de las mismas (Figura 9A, 9B). En el grupo de CTM-MO administradas por vía i.v. no se observó implantación de éstas en la zona de la lesión ni a las 24h ni a los 14 días después del IC (Figura 9C, 9D). Sin embargo, cuando las CTM-MO fueron administradas por vía i.c., se observaron células en la zona de la lesión tanto a las 24h como a los 14 días (Figura 9E, 9F).

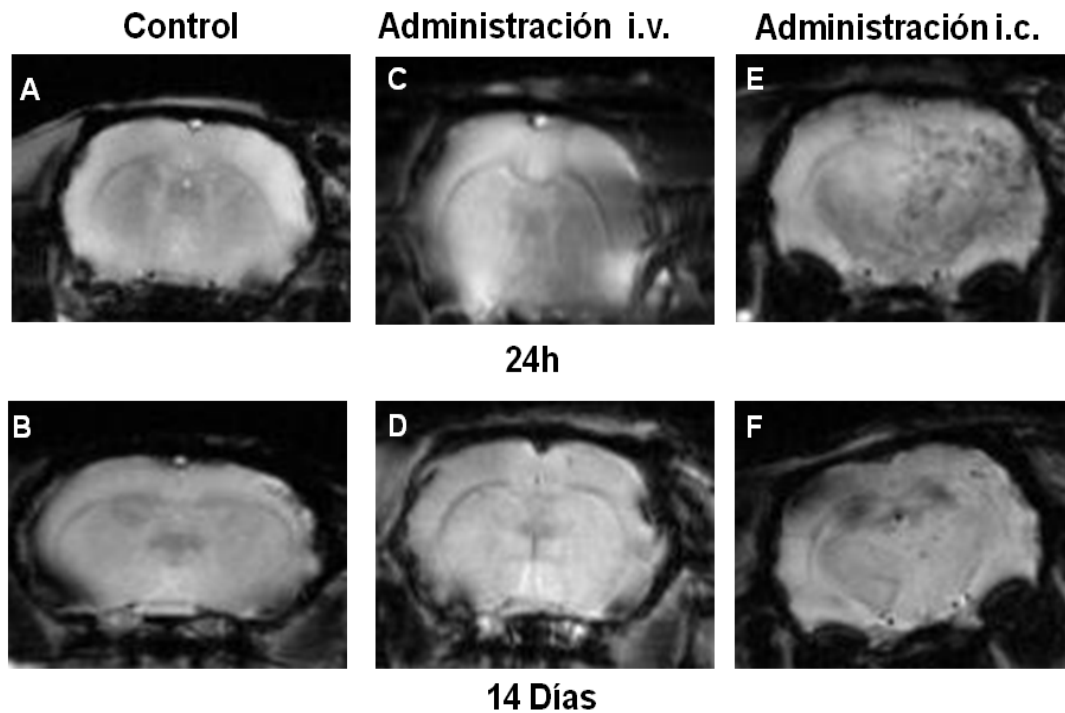


Figura 9. Implantación de CTM-MO por RM a las 24h y 14 días después del IC. La primera columna, muestra los grupos controles donde no se observó implantación de CTM-MO al no administrarse células. En la segunda columna, cuando las CTM-MO se administraron por vía i.v. no se observó implantación de las células en el área de la lesión, sin embargo en la tercera columna se puede observar como la administración i.c. mostró implantación de CTM-MO en la zona lesionada a las 24h y 14 días después del IC.

También se analizó la implantación de las CTM-MO por inmunofluorescencia a los 14 días (con Dil) y se confirmaron los mismos resultados que por la técnica de RM. En los grupos control al no existir administración de células no se observó implantación de las mismas. En el grupo de CTM-MO administradas por vía i.v. no se observó implantación de las células en la zona de la lesión, observándose sólo en los animales tratados por vía i.c. (Figura 10).

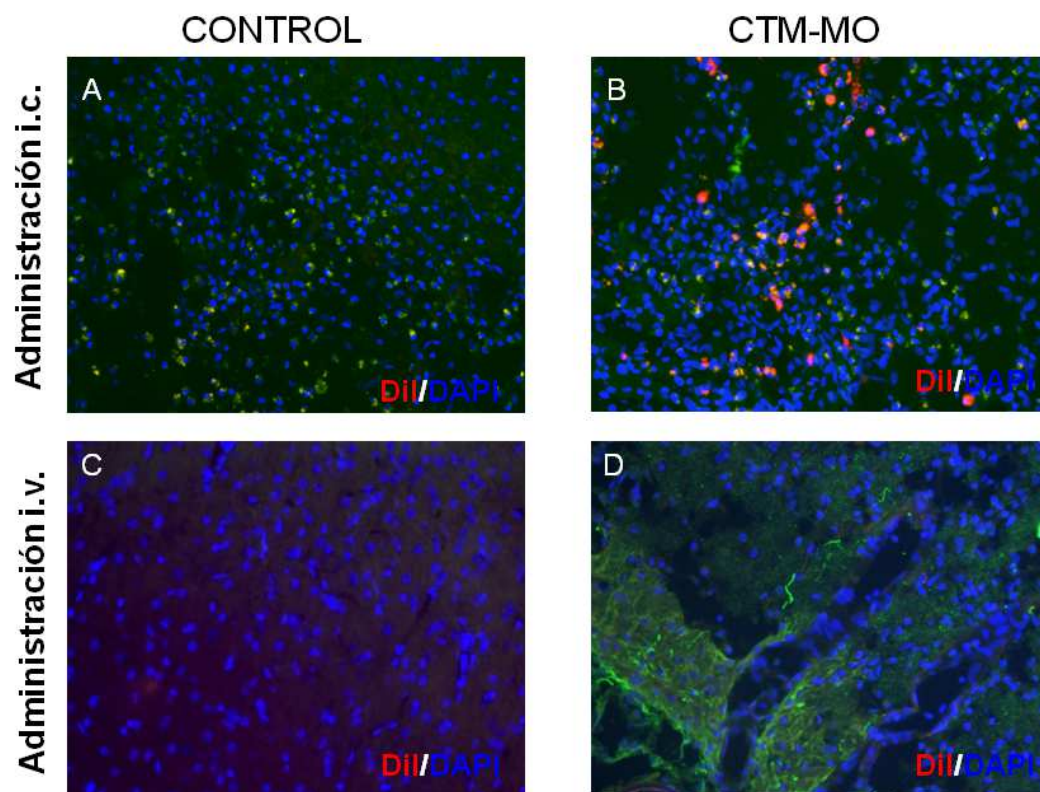


Figura 10. Implantación de CTM-MO a los 14 días después del IC por inmunofluorescencia. Antes de la administración, las CTM-MO fueron marcadas con Dil (rojo). Las imágenes por microscopía de fluorescencia (20x) muestran grupos controles (A,C) y tratados (B,D) por las diferentes rutas de administración. La implantación de CTM-MO en la zona de la lesión sólo se observó en animales tratados por vía i.c. (B).

3.3. Tamaño de lesión analizado por RM y H&E

El tamaño de lesión fue medido por RM a las 24h y 14 días y por H&E a los 14 días (Tabla 6, Figura 11). En el grupo sham no se observó lesión cerebral al ser animales sólo sometidos a cirugía pero no IC. Todos los valores fueron menores a los 14 días que a las 24h debido al edema que aparece en los primeros días después del daño cerebral. Los grupos controles y tratados presentaron porcentajes similares de tamaño de lesión tanto a las 24h como a los 14 días. Ninguno de los tratamientos redujo significativamente el tamaño de lesión con respecto a los grupos control ($P>0,05$).

Tabla 6. Valores de tamaño de lesión analizados por RM a las 24h y 14 días y H&E a los 14 días. Tanto los grupos controles como los tratados mostraron valores similares en el tamaño de lesión a las 24h como a los 14 días ($P>0,05$). Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar.

Grupos	RM 24h	RM 14 días	H&E 14 días
CONTROL i.c.	24,726 \pm 7,63	14,91 \pm 6,25	20,48 \pm 5,18
CONTROL i.v.	21,89 \pm 4,38	13,124 \pm 3,16	16,98 \pm 7,03
CTM-MO i.c.	20,31 \pm 3,71	13,33 \pm 3,90	12,51 \pm 1,29
CTM-MO i.v.	17,65 \pm 3,27	13,04 \pm 3,69	14,092 \pm 3,19

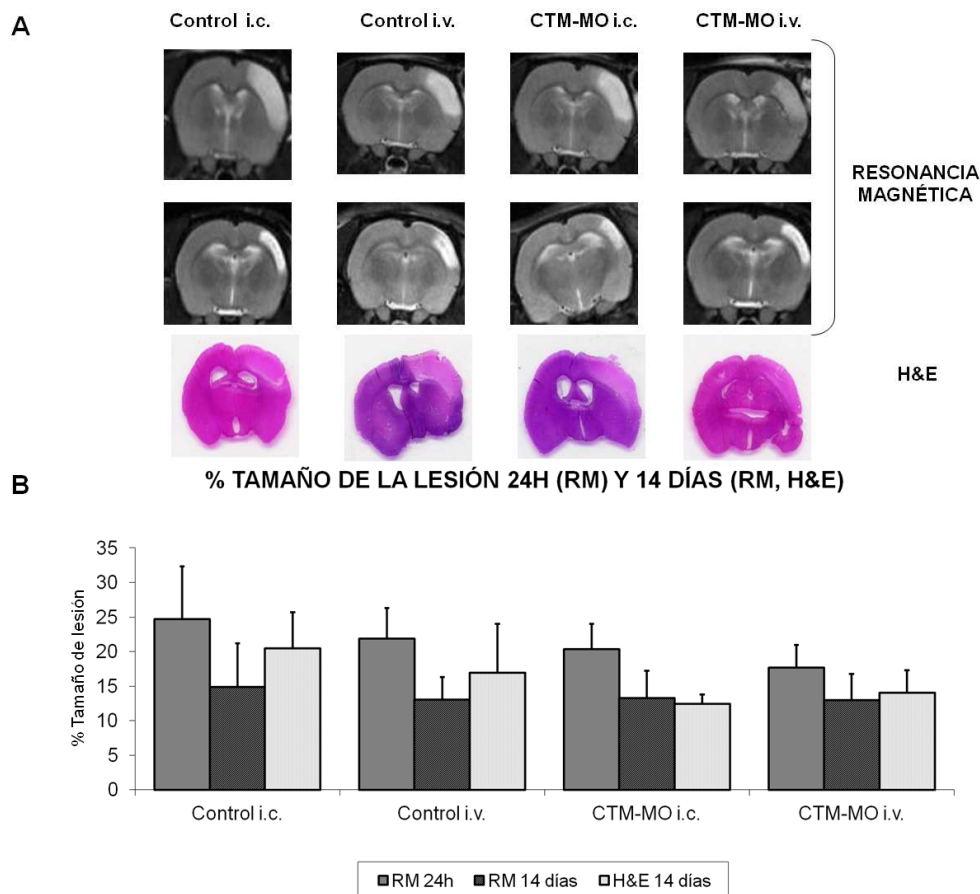


Figura 11. A. Imágenes de tamaño de lesión por RM a las 24h y 14 días y H&E a los 14 días. Las imágenes muestran el tamaño de lesión de grupos controles y tratados a las 24h y 14 días por RM y a los 14 días por H&E. **B. Porcentajes de tamaño de lesión a las 24h y 14 días por RM y a los 14 días por H&E.** Todos los grupos de estudio mostraron un tamaño de la lesión menor a los 14 días en comparación a las 24h sin diferencias significativas. Todos los grupos de tratamiento mostraron un tamaño de lesión similar a los 14 días para las dos técnicas utilizadas. Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar.

3.4. Inmunohistoquímica:

Se analizó la muerte celular y la proliferación en la zona de peri-infarto a los 14 días después de la lesión mediante técnicas de inmunohistoquímica.

3.4.1. Muerte celular

En el grupo de animales sham y en el hemisferio contralateral de los animales operados no se hallaron células TUNEL positivas. El tratamiento con CTM-MO redujo el número de células TUNEL positivas independientemente de la ruta de administración. A los 14 días, el grupo control i.c. ($43 \pm 1,42$) mostró un mayor número de células TUNEL positivas con respecto al grupo de tratamiento CTM-MO i.c. ($24 \pm 8,7$) ($P=0,004$). Además, también se observó que el grupo control i.v. ($41 \pm 6,4$) tenía un mayor número de células TUNEL positivas con respecto al grupo de tratamiento CTM-MO i.v. ($26 \pm 5,5$) ($P=0,03$) (Figura 12).

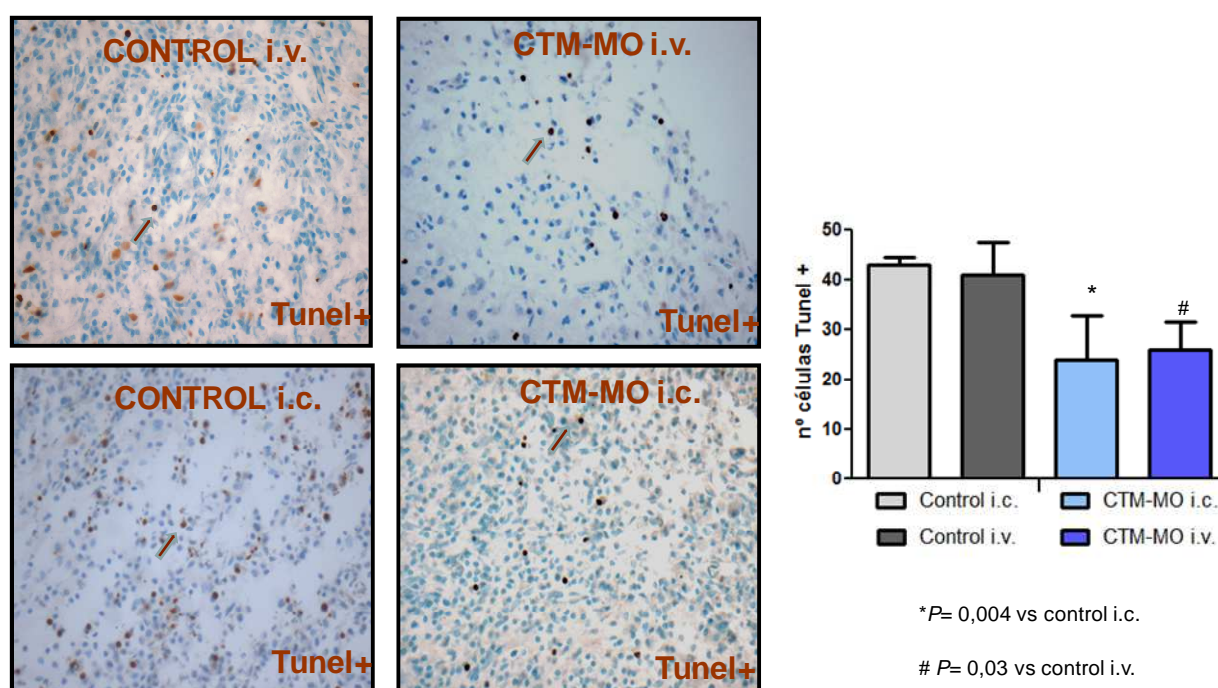
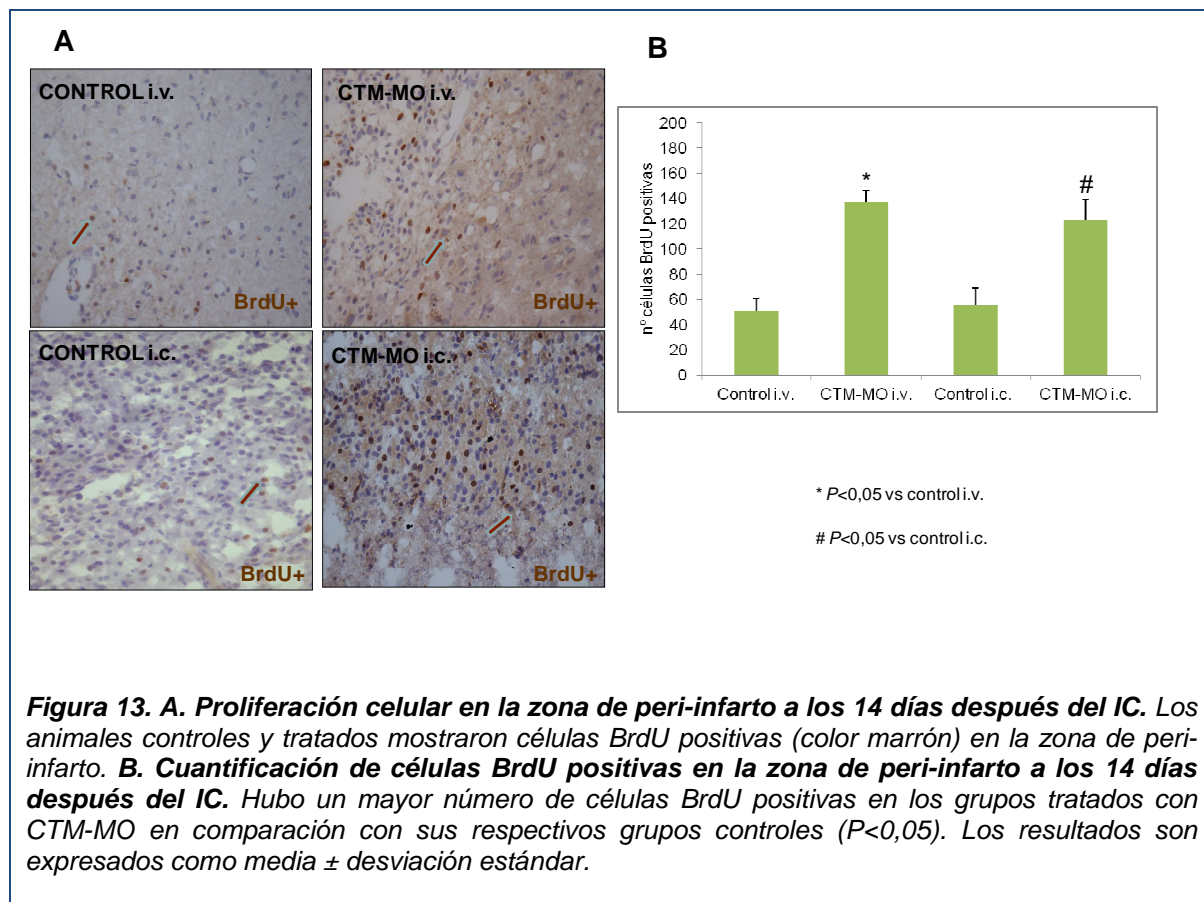


Figura 12. Muerte celular en el hemisferio lesionado por la técnica TUNEL. Se observó un mayor número de células TUNEL+ (color marrón) en los grupos controles con diferencias significativas en comparación con los grupos de tratamiento de CTM-MO independientemente de las vías de administración ($P^*=0,004$, $P^{\#}=0,03$). Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar.

3.4.2. Proliferación celular

Los grupos de animales sham no mostraron células BrdU positivas en la zona de peri-infarto a los 14 días. El número de células BrdU positivas en la zona de peri-infarto fue mayor en los animales tratados con CTM-MO en comparación con los animales control a los 14 días (Figura 13). Al llevar a cabo la cuantificación de estas células se observó que en el grupo control i.v. ($51 \pm 9,9$) se apreciaba un menor número de células BrdU positivas con respecto al grupo de tratamiento CTM-MO i.v. ($137,5 \pm 9,2$) ($P < 0,05$). Lo mismo observamos cuando se analizó el grupo control i.c. ($55,5 \pm 13,95$) que aparecía significativamente un menor número de células BrdU positivas con respecto el grupo de tratamiento CTM-MO i.c. ($123 \pm 16,59$) ($P < 0,05$). Por otro lado, al analizar los grupos de tratamiento de CTM-MO por diferentes vías de administración, no presentaron diferencias significativas entre ellos.



3.5. Determinación de citocinas pro-inflamatorias: TNF- alpha e IL-6

Las determinaciones de TNF- alpha e IL-6 en plasma se llevaron a cabo a los 14 días después del IC (Figura 14).

Los niveles más elevados de TNF-alpha en plasma a los 14 días del IC se observaron en los animales controles i.c. ($154,13 \pm 25$) y tratados CTM-MO i.v. ($107,1 \pm 31,05$). El grupo control i.c. mostró niveles significativamente más altos de esta citocina con respecto al grupo de tratamiento CTM-MO i.c. ($56,04 \pm 10,04$; $P=0,001$). Además, el grupo de tratamiento CTM-MO i.v. ($107,1 \pm 31,05$) expresó niveles más elevados de esta citocina, apareciendo diferencias significativas con respecto al grupo control i.v. ($43,95 \pm 11,06$; $P<0,05$).

Al igual que en TNF-alpha, los niveles plasmáticos de IL-6 son más elevados en los animales controles i.c. ($132,57 \pm 16,8$) y los tratados CTM-MO i.v. ($100,46 \pm 38,1$) con respecto a los demás grupos de estudio. Existieron diferencias significativas entre el grupo control i.c. con respecto al grupo de tratamiento CTM-MO i.c. ($49,67 \pm 10,08$; $P=0,001$) y entre el grupo control i.v. ($56,01 \pm 14,87$) con respecto al grupo de tratamiento CTM-MO i.v. ($100,46 \pm 38,1$; $P<0,05$). Además, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento ($P=0,011$).

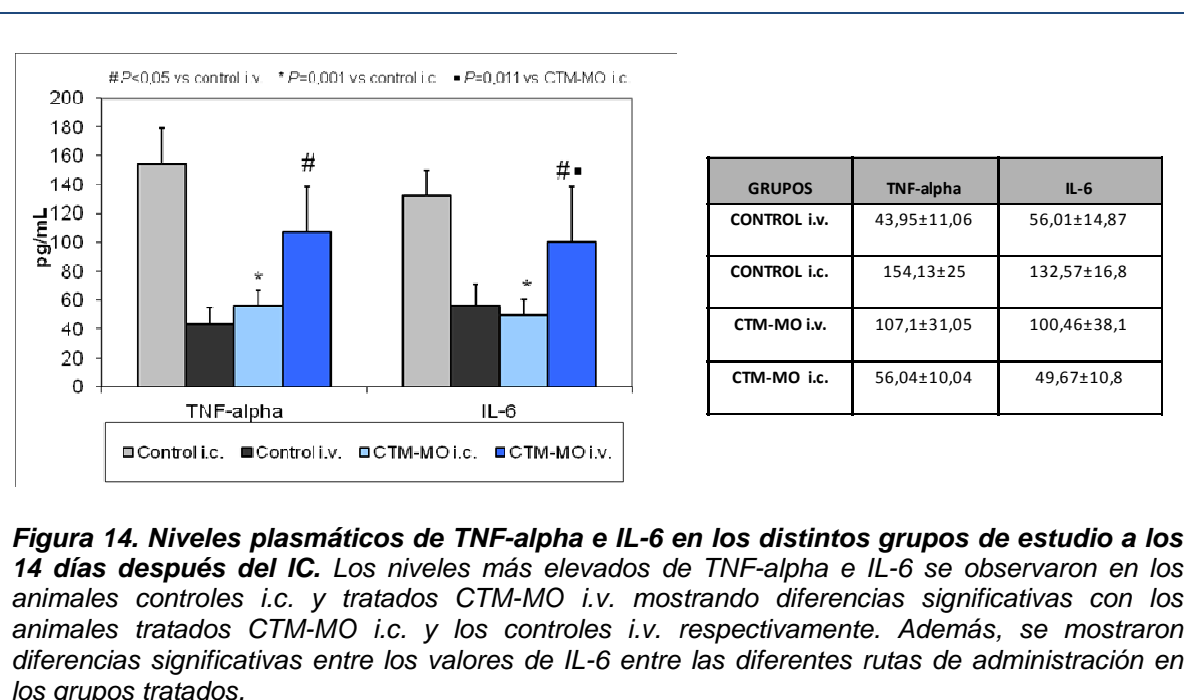
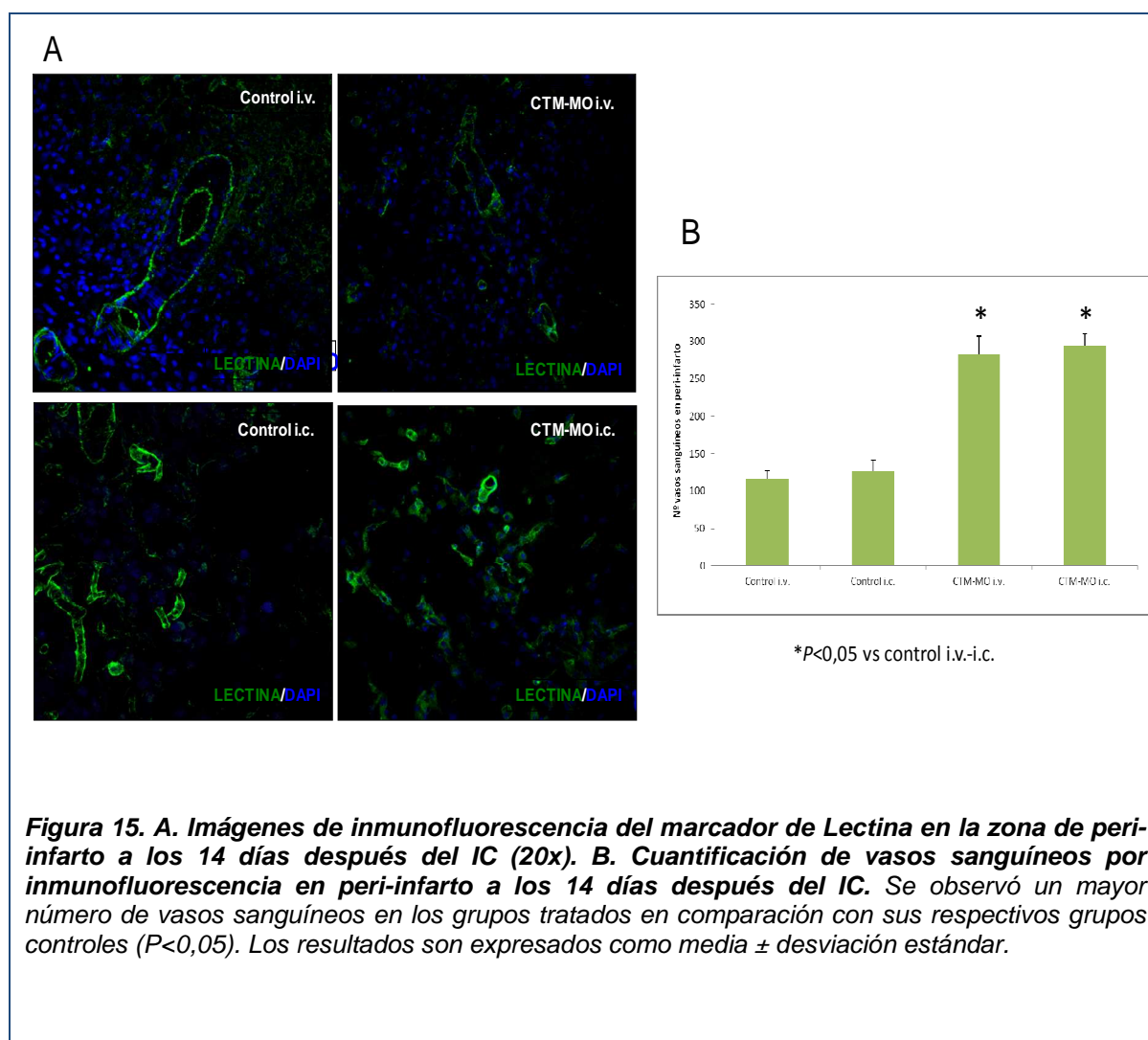


Figura 14. Niveles plasmáticos de TNF-alpha e IL-6 en los distintos grupos de estudio a los 14 días después del IC. Los niveles más elevados de TNF-alpha e IL-6 se observaron en los animales controles i.c. y tratados CTM-MO i.v. mostrando diferencias significativas con los animales tratados CTM-MO i.c. y los controles i.v. respectivamente. Además, se mostraron diferencias significativas entre los valores de IL-6 entre las diferentes rutas de administración en los grupos tratados.

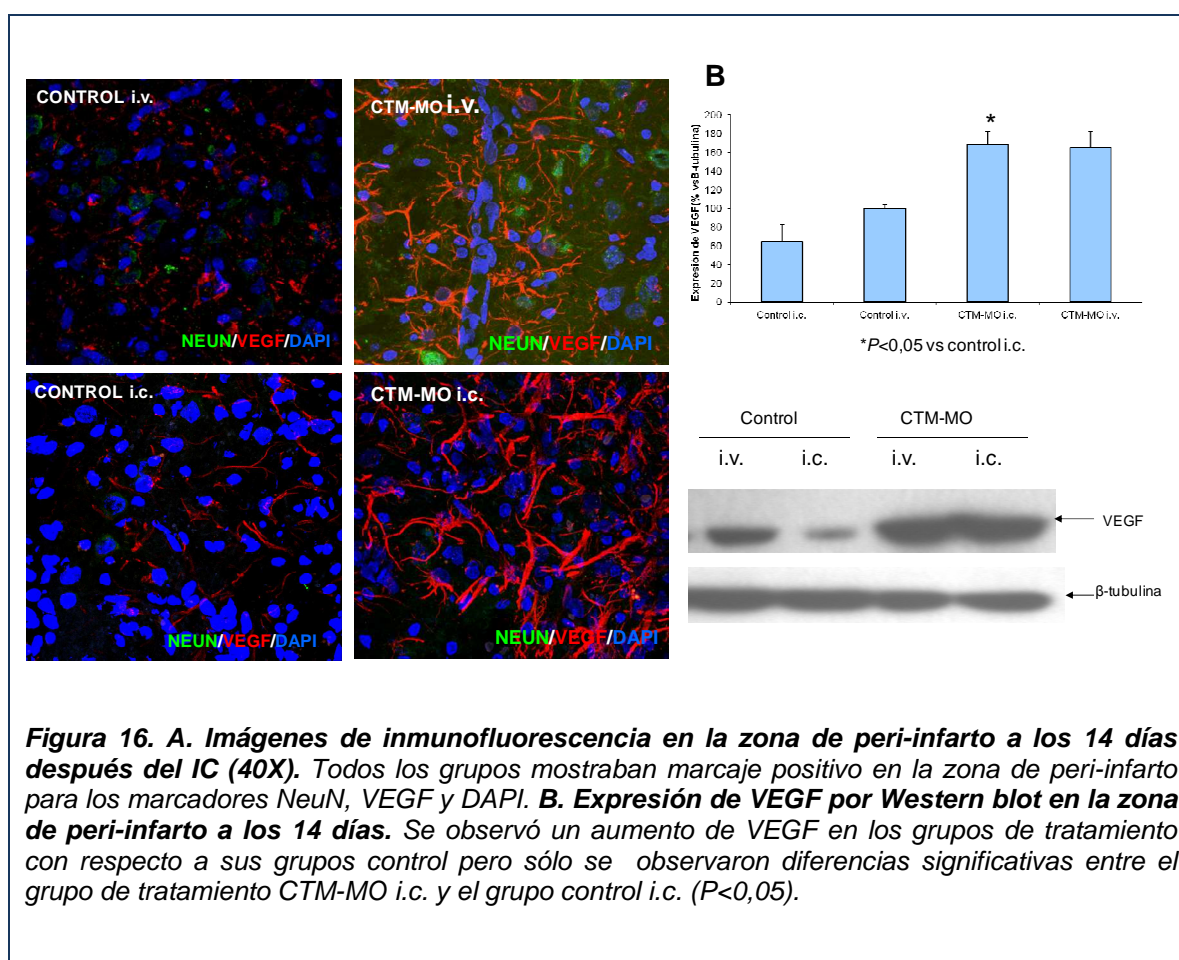
3.6. Estudio de la expresión de Lectina en la zona de peri-infarto

Se analizó la expresión de los vasos sanguíneos con el marcaje de Lectina en la zona de peri-infarto por inmunofluorescencia a los 14 días después del IC, tanto en los animales controles como en los tratados con CTM-MO (Figura 15). Al llevar a cabo la cuantificación de los vasos sanguíneos se observó que los grupos de tratamientos CTM-MO i.v. ($283,5 \pm 23,3$) y CTM-MO i.c. ($294,5 \pm 16,3$) presentaron significativamente un mayor número de vasos sanguíneos en comparación con sus respectivos grupos control ($117 \pm 9,9$; $127 \pm 14,1$) ($P < 0,05$), sin observarse diferencias significativas entre los grupos de tratamiento.



3.7. Estudio de la expresión de VEGF en la zona de peri-infarto

Se analizó la expresión del marcador VEGF en la zona de peri-infarto por inmunofluorescencia a los 14 días después del IC, tanto en los animales control como en tratados con CTM-MO independientemente de la ruta de administración. Para ello, se realizaron triples marcajes con NeuN, VEGF y DAPI (40x). Todos los grupos de animales presentaban marcaje positivo en la zona de peri-infarto para estos tres marcadores (Figura 16A). Al llevar a cabo la cuantificación de VEGF por Western blot en la zona de peri-infarto se observó que la expresión de este marcador en los grupos de tratamiento fue mayor con respecto a sus grupos control, pero sólo presentaron diferencias significativas el grupo de tratamiento CTM-MO i.c. ($168 \pm 14,7$) ($P < 0,05$) y su grupo control i.c. ($64,8 \pm 18$). No se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento independientemente de la ruta de administración (Figura 16B).



3.8. Estudio de co-marcajes de CTM-MO en la zona de peri-infarto

Se llevaron a cabo co-marcajes de Dil con CTM-MO para los marcadores: NeuN, NF, VEGF, GFAP y CD11 para analizar hacia que estirpe celular se diferenciaban las CTM-MO administradas por vía i.c. en estos animales. Se observó a los 14 días que algunas células Dil positivas presentaban co-marcaje con el marcador de macrófagos y microglía CD11, así como, con el marcador neuronal NF (Figura 17).

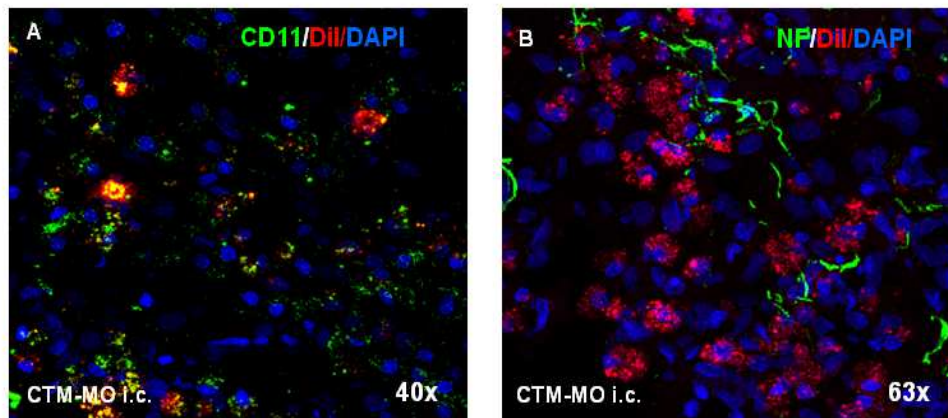


Figura 17. A. Imágen de co-marcajes por inmunofluorescencia del marcador Dil con CD11 y DAPI (40x) B. Imagen de co-marcaje del marcador Dil con neurofilamento (NF) y DAPI (63x) en la zona de peri-infarto a los 14 días después del IC.

4. VARIABLES DE ESTUDIO DE LA COMPARATIVA ENTRE CTM-MO Y CTM-TA

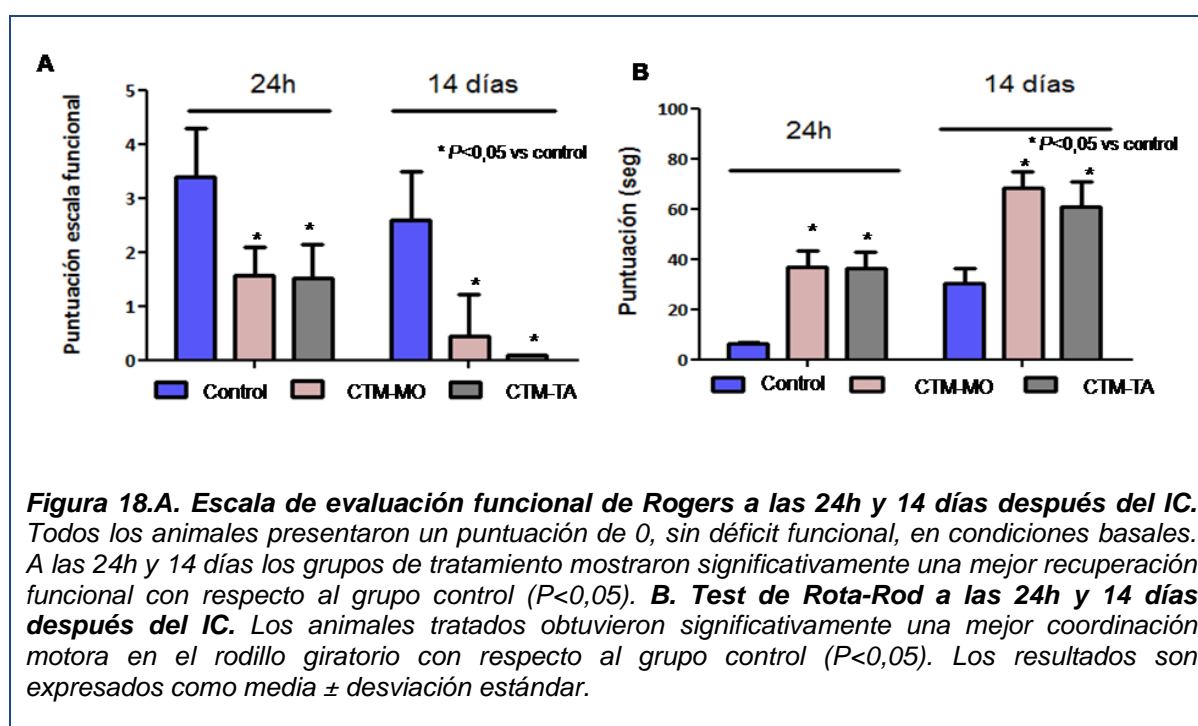
4.1. Evaluación funcional

Se llevó a cabo una evaluación funcional en todos los animales a las 24h y a los 14 días después del IC.

Todos los animales presentaron un puntuación de 0 en la escala de Rogers, sin déficit funcional, en condiciones basales. En el grupo sham, todos los animales obtuvieron una puntuación de 0 en todas las evaluaciones. El grupo control, mostró peor déficit funcional en la escala de evaluación de Rogers mientras que los animales tratados mostraron una buena recuperación funcional a las 24h y a los 14 días, independientemente de la estirpe celular, sin diferencias significativas entre ambos grupos. Los grupos de tratamiento de

CTM-MO ($1,57 \pm 0,53$; $0,43 \pm 0,78$) y CTM-TA ($1,51 \pm 0,62$; 0 ± 0) mostraron significativamente una buena recuperación funcional en comparación con el grupo control ($3,4 \pm 0,89$; $2,6 \pm 0,89$) a las 24h y 14 días, respectivamente ($P < 0,05$) (Figura 18A).

Con respecto al test de Rota-Rod, se observó que los animales tratados CTM-MO ($37 \pm 6,36$; $68,15 \pm 6,86$) y CTM-TA ($36,2 \pm 6,63$; $60,9 \pm 10,04$) obtuvieron significativamente valores más elevados, mostrando una mejor coordinación motora, en comparación al grupo control ($6,25 \pm 0,35$; $30,45 \pm 5,87$) tanto a las 24h como a los 14 días respectivamente ($P < 0,05$) (Figura 18B).



4.2. Tamaño de lesión analizado por RM y H&E

El tamaño del IC fue medido por RM a las 24h y 14 días y por H&E a los 14 días. El grupo sham no mostró lesión. Todos los valores fueron menores a los 14 días que a las 24h debido al edema. Ninguno de los tratamientos, CTM-MO y CTM-TA, redujo significativamente el tamaño de la lesión con respecto al grupo control ($P > 0,05$) (Tabla 7, Figura 19).

Tabla 7. Valores de tamaño de lesión analizados por RM a las 24h y 14 días y H&E a los 14 días. Ninguno de los tratamientos disminuyó este parámetro de manera significativa con respecto al grupo control ($P>0,05$). Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar.

Grupos	RM 24h	RM 14 días	H&E 14 días
CONTROL	21,89 \pm 4,38	13,124 \pm 3,16	16,98 \pm 7,03
CTM-MO	17,65 \pm 3,27	13,04 \pm 3,69	14,092 \pm 3,19
CTM-TA	17,16 \pm 9,19	12,25 \pm 5,97	13,73 \pm 3,20

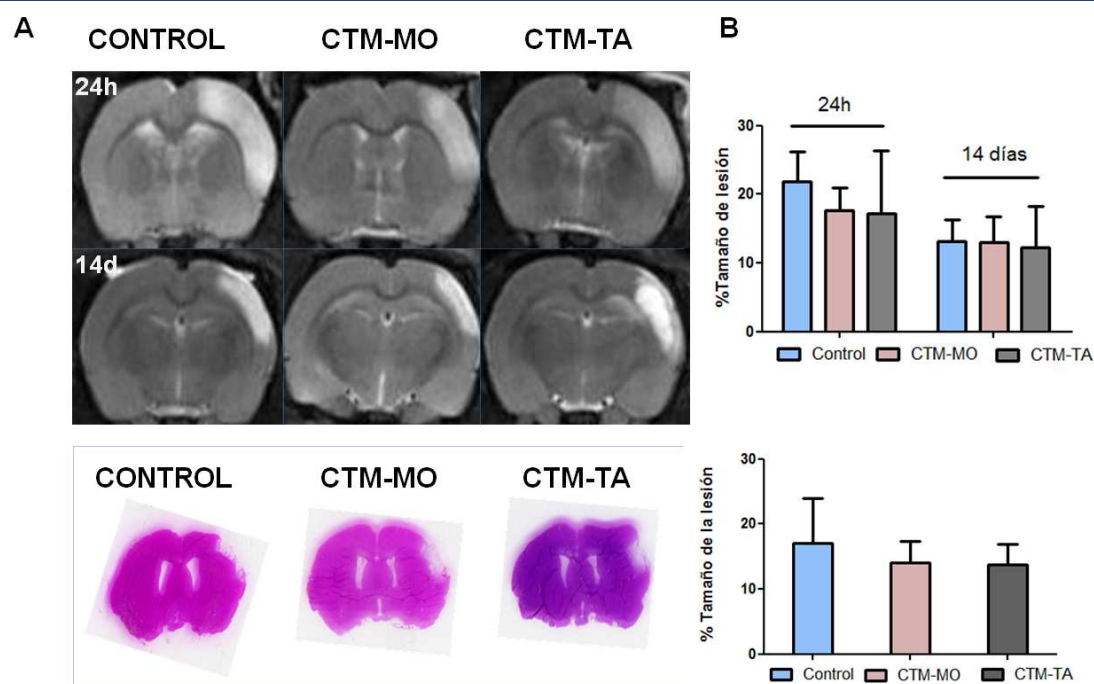


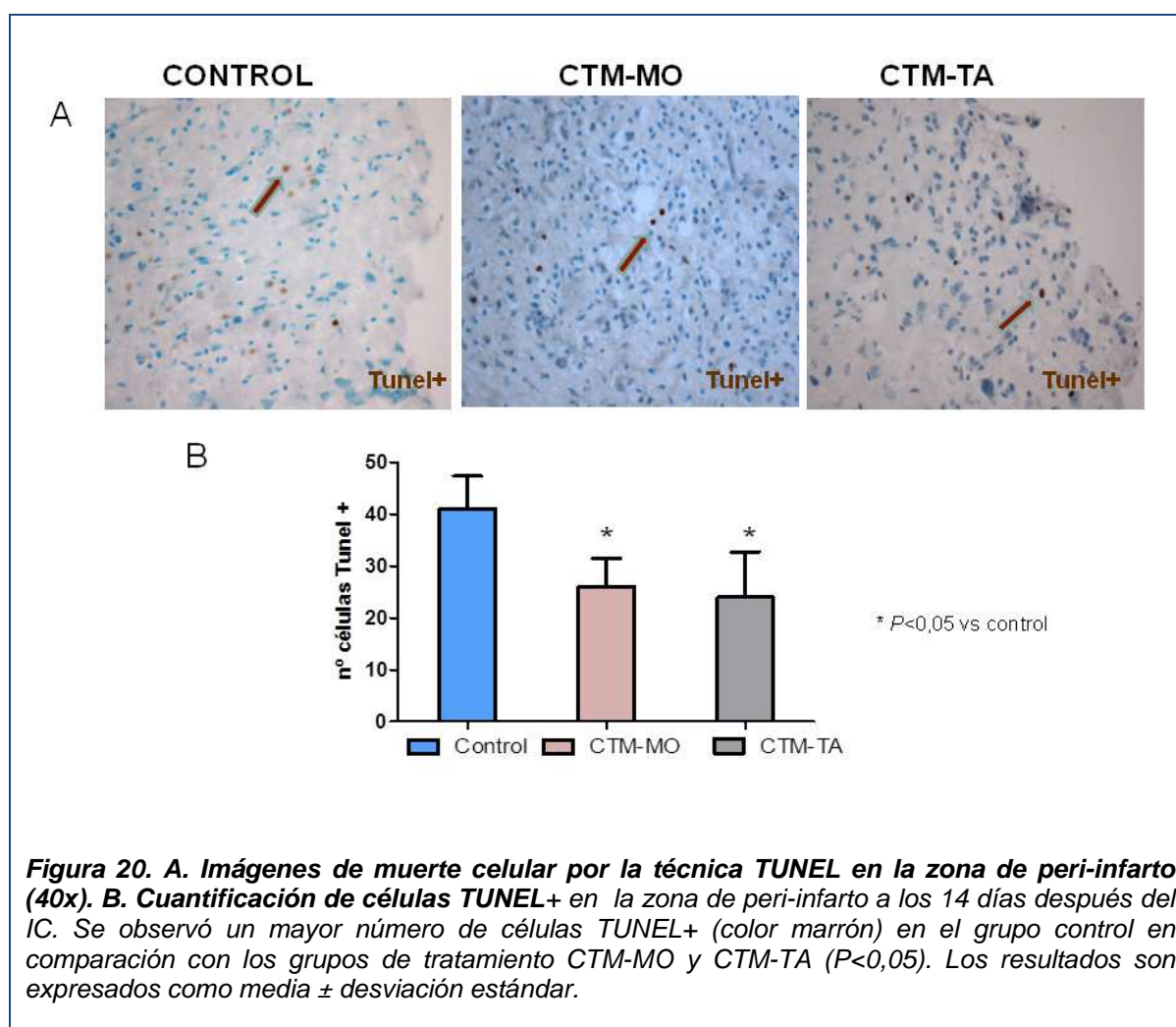
Figura 19. A. Imágenes de tamaño de lesión por RM a las 24h y 14 días y H&E a los 14 días. Las imágenes muestran el tamaño de la lesión del grupo control y tratados a las 24h y 14 días por RM y por H&E a los 14 días. **B. Porcentajes de tamaño de lesión por RM a las 24h y 14 días y H&E a los 14 días.** Todos los grupos mostraron un menor tamaño de la lesión a los 14 días en comparación a las 24h sin mostrar diferencias significativas. Todos los grupos de tratamiento mostraron un tamaño de lesión similar a los 14 días por las dos técnicas utilizadas. Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar.

4.3. Inmunohistoquímica:

Se analizó la muerte celular y la proliferación celular en la zona de peri-infarto a los 14 días después de la lesión mediante técnicas de inmunohistoquímica.

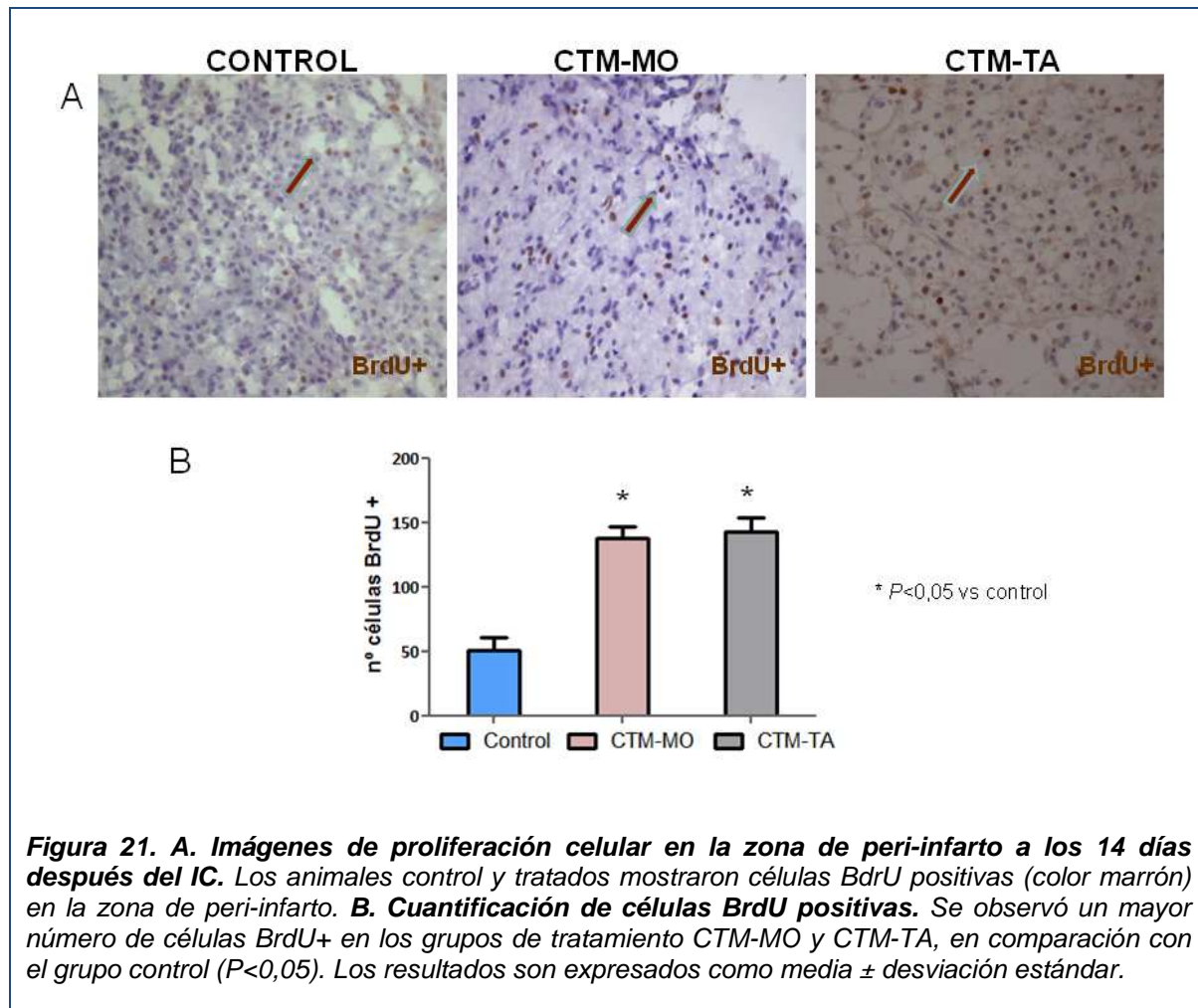
4.3.1. Muerte celular

En el grupo sham no se observaron células TUNEL positivas ni tampoco en el hemisferio contralateral de los animales operados (Figura 20A). El grupo control ($41 \pm 6,4$) mostró significativamente un mayor número de células TUNEL positivas con respecto a los grupos de tratamiento CTM-MO ($26 \pm 5,5$) y CTM-TA ($24 \pm 8,79$) en la zona de peri-infarto ($P < 0,05$) (Figura 20B).



4.3.2. Proliferación celular

El grupo de animales sham no mostró células BrdU positivas en la zona de peri-infarto a los 14 días. El número de células BrdU positivas fue mayor en los animales tratados con CTM-MO y CTM-TA en comparación con los controles (Figura 21A). Al llevar a cabo la cuantificación de estas células se observó que el grupo control ($51 \pm 9,9$) tenía significativamente un menor número de células BrdU positivas respecto a los grupos que recibieron el tratamiento con CTM-MO ($137,5 \pm 9,2$) y CTM-TA ($142,81 \pm 11,12$) ($P < 0,05$) (Figura 21B).



Por otro lado, se estudiaron co-marcajes de BrdU con NeuN, NF, VEGF, GFAP y CD11 para analizar hacia qué estirpe se diferenciaban esas nuevas células *de novo* tanto en los animales control como en los tratados con CTM-MO y CTM-TA, ya que se había observado un aumento en la proliferación celular en éstos. Se observó a los 14 días que algunas células BrdU positivas co-marcaban con el marcador neuronal NF y de astrocitos GFAP en la zona de peri-infarto (Figura 22).

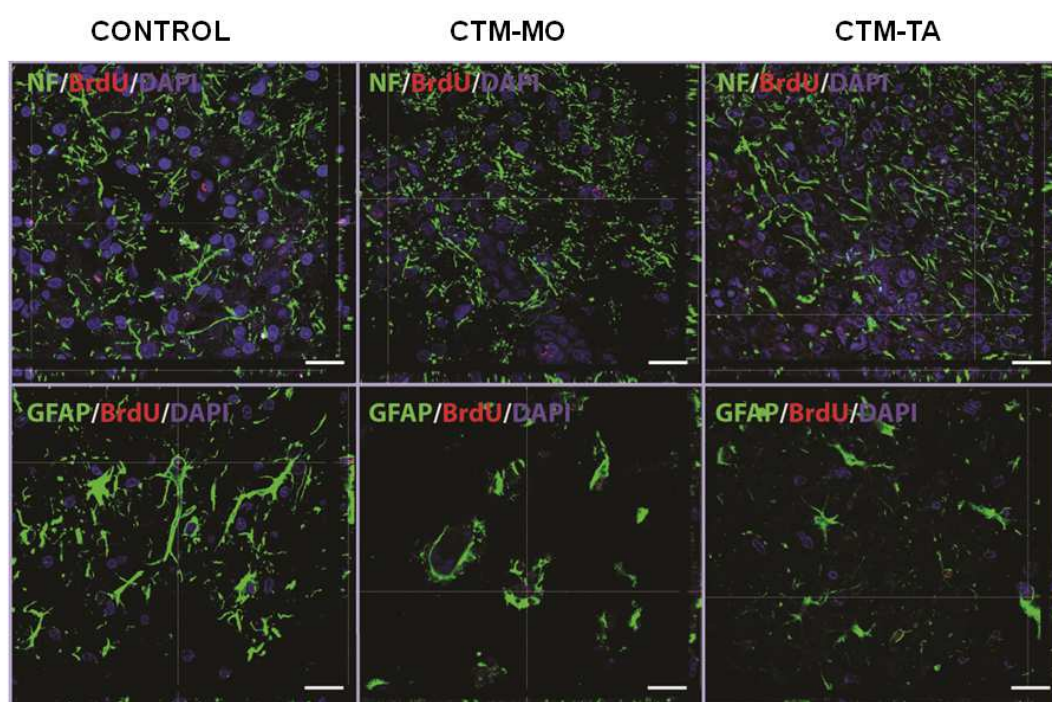


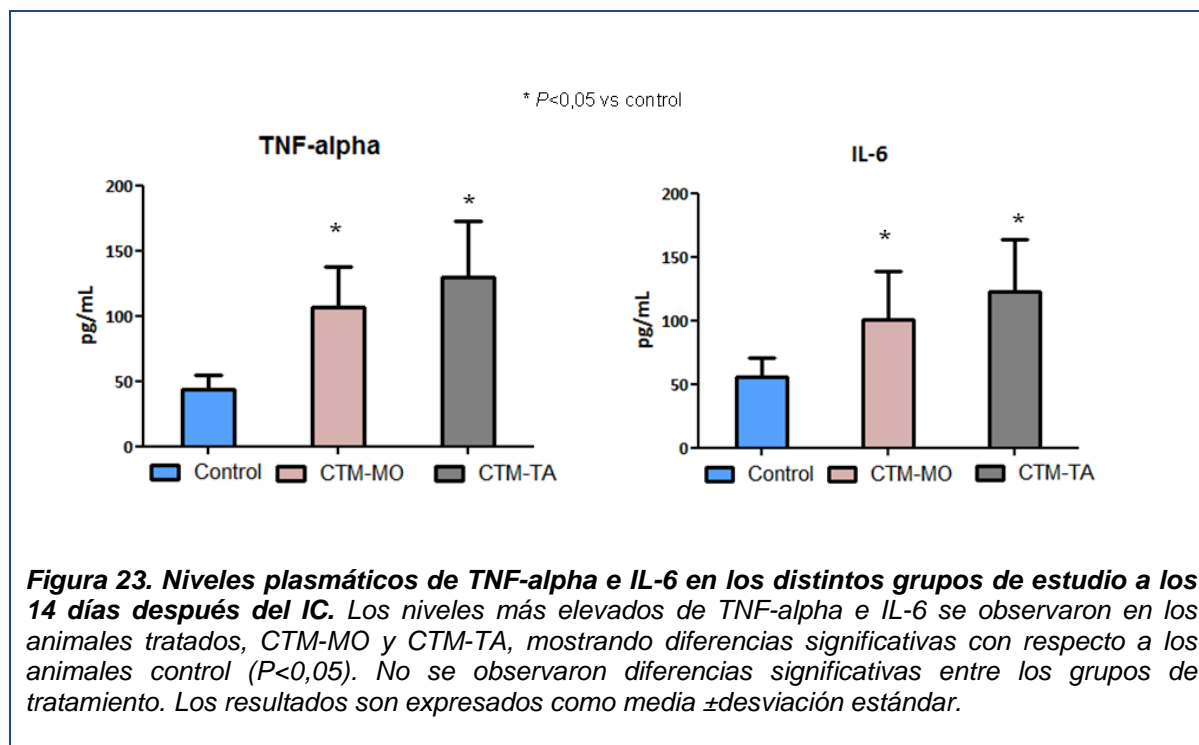
Figura 22. Imágenes de co-marcajes por inmunofluorescencia del marcador BrdU con neurofilamento (NF) (40x) y con GFAP (40x) en animales control y tratados con CTM-MO y CTM-TA en la zona de peri-infarto a los 14 días después del IC.

4.4. Determinación de citocinas pro-inflamatorias: TNF- alpha e IL-6

Las determinaciones de TNF- alpha e IL-6 en plasma se llevaron a cabo a los 14 días después del IC (Figura 23).

Los grupos de tratamiento mostraron niveles plasmáticos más elevados de TNF-alpha ((CTM-MO (107,1±31,05); CTM-TA (129,32±43,19)) en comparación con el grupo control

(43,95±11,06; $P<0,05$). Al igual que en TNF- α , los niveles plasmáticos de IL-6 son significativamente más elevados en los grupos de tratamiento ((CTM-MO (100,46±38,1); CTM-TA (122,58±40,75)) en comparación con el grupo control (56,01±14,87; $P<0,05$).



4.5. Estudio de la expresión de marcadores de reparación en la zona de peri-infarto

Se analizó la expresión de marcadores de reparación en la zona de peri-infarto mediante inmunofluorescencia y Western blot a los 14 días después del IC, tanto en los animales control como en los tratados con CTM-MO y CTM-TA.

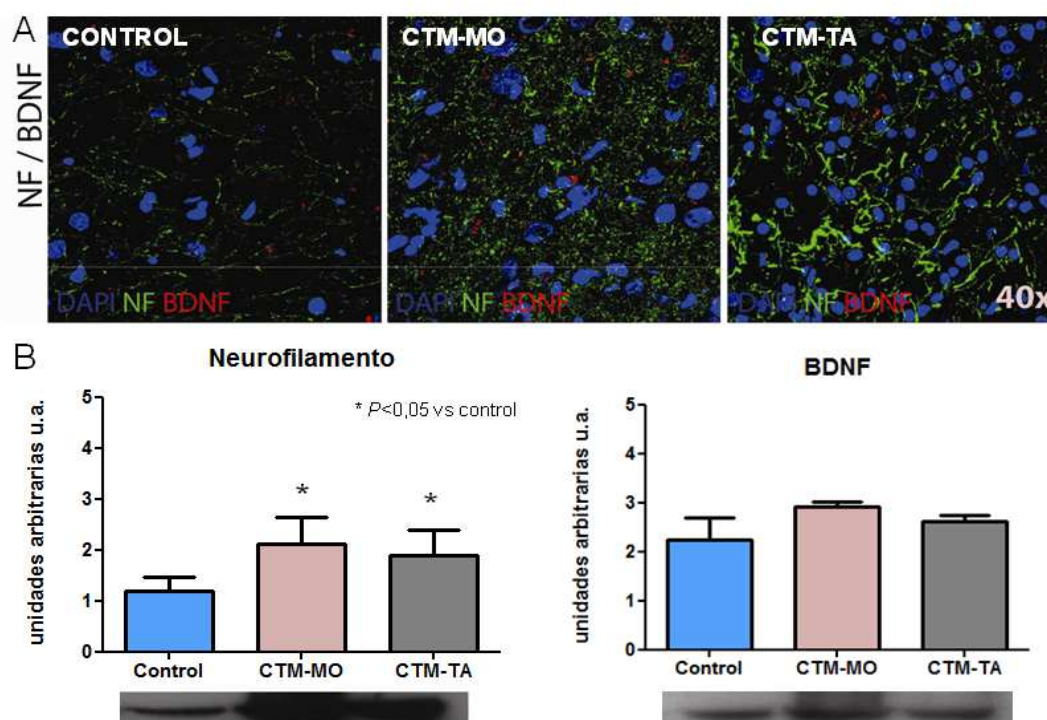
4.5.1. Expresión del marcador NF y BDNF

Se analizó la expresión del marcador de NF y BDNF en la zona de peri-infarto por inmunofluorescencia a los 14 días después del IC, tanto en los animales control como en los tratados con CTM-MO y CTM-TA. Para ello, se realizaron triples marcajes con NF, BDNF y DAPI (40x). Todos los grupos de animales presentaban marcaje positivo en la zona de peri-infarto para estos tres marcadores (Figura 24A).

Al llevar a cabo la cuantificación por Western blot de NF en la zona de peri-infarto se observó que la expresión de este marcador era significativamente mayor en los animales

tratados con CTM-MO ($2,10 \pm 0,54$) y CTM-TA ($1,9 \pm 0,48$) que en los animales control ($1,18 \pm 0,29$) a los 14 días después del IC ($P < 0,05$) (Figura 24B).

Cuando se analizó el marcador BDNF en la zona de peri-infarto no se observó una mayor expresión en los grupos de tratamiento, CTM-MO ($2,91 \pm 0,096$) y CTM-TA ($2,61 \pm 0,13$), con respecto al grupo control ($2,24 \pm 0,44$) ($P > 0,05$) (Figura 24B).



4.5.2. Expresión del marcador GFAP

Se analizó la expresión del marcador de GFAP en la zona de peri-infarto por inmunofluorescencia en los animales control y los tratados con CTM-MO y CTM-TA a los 14 días después del IC. Para ello, se realizaron dobles marcajes con GFAP y DAPI (40x).

Todos los grupos de animales presentaban marcaje positivo para estos dos marcadores en la zona de peri-infarto (Figura 25A).

Al llevar a cabo la cuantificación de GFAP por Western blot en la zona de peri-infarto se observó que la expresión de este marcador de astrocitos era significativamente mayor en los animales control ($3,76 \pm 0,315$) que en los animales tratados con CTM-MO ($2,45 \pm 0,05$) y CTM-TA ($2,075 \pm 0,175$) ($P < 0,05$) (Figura 25B).

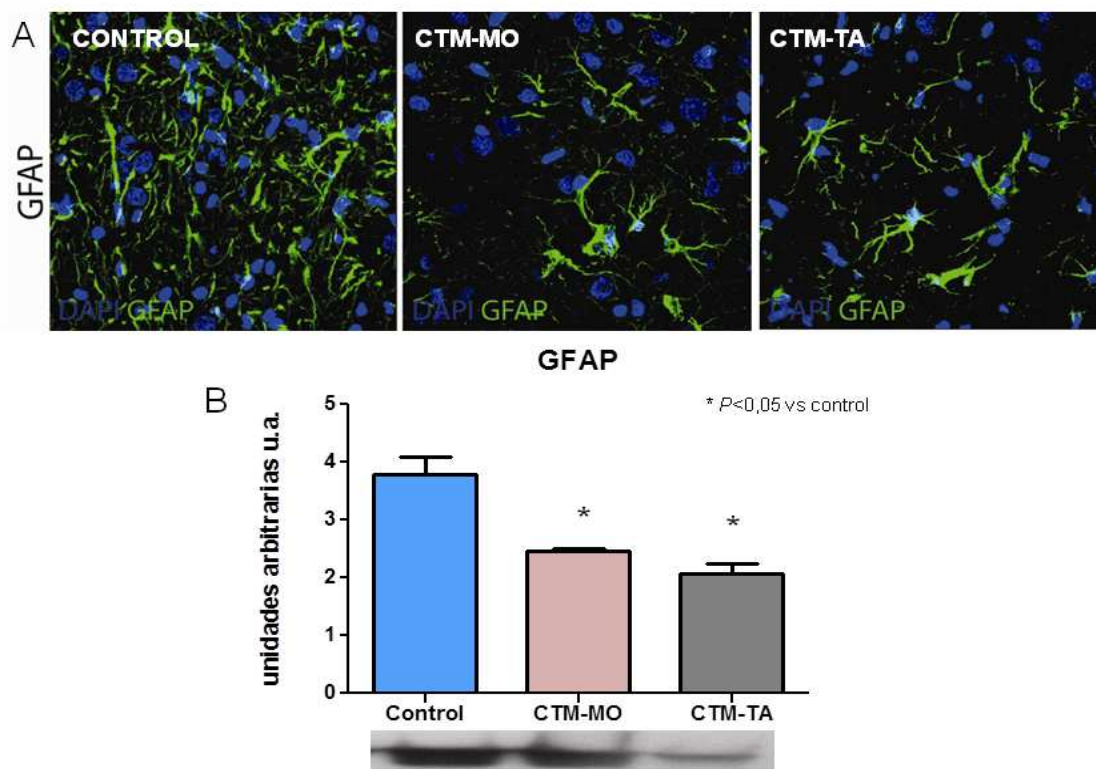


Figura 25. A. Imágenes de inmunofluorescencia de GFAP y DAPI en animales control y tratados en la zona de peri-infarto a los 14 días después del IC (40x). **B.** Cuantificación por Western blot de los niveles de GFAP en los grupos control y tratados. Se observó una menor expresión de GFAP en los grupos de tratamiento con respecto al grupo control ($P < 0,05$). Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar.

4.5.3. Expresión del marcador Olig-2.

Se analizó la expresión del marcador Olig-2 en la zona de peri-infarto por inmunofluorescencia en los animales control y en los tratados con CTM-MO y CTM-TA a

los 14 días después del IC. Para ello, se realizaron dobles marcajes con Olig-2 y DAPI (40x). Todos los grupos de animales presentaban marcaje positivo en la zona de peri-infarto para estos dos marcadores (Figura 26A).

Al llevar a cabo la cuantificación por Western blot de esta proteína en la zona de peri-infarto se observó que la expresión de este marcador era significativamente mayor en los animales tratados con CTM-MO ($2,89 \pm 0,17$) y CTM-TA ($2,66 \pm 0,14$) que en los animales control ($2,05 \pm 0,46$) a los 14 días después del IC ($P < 0,05$) (Figura 26B).

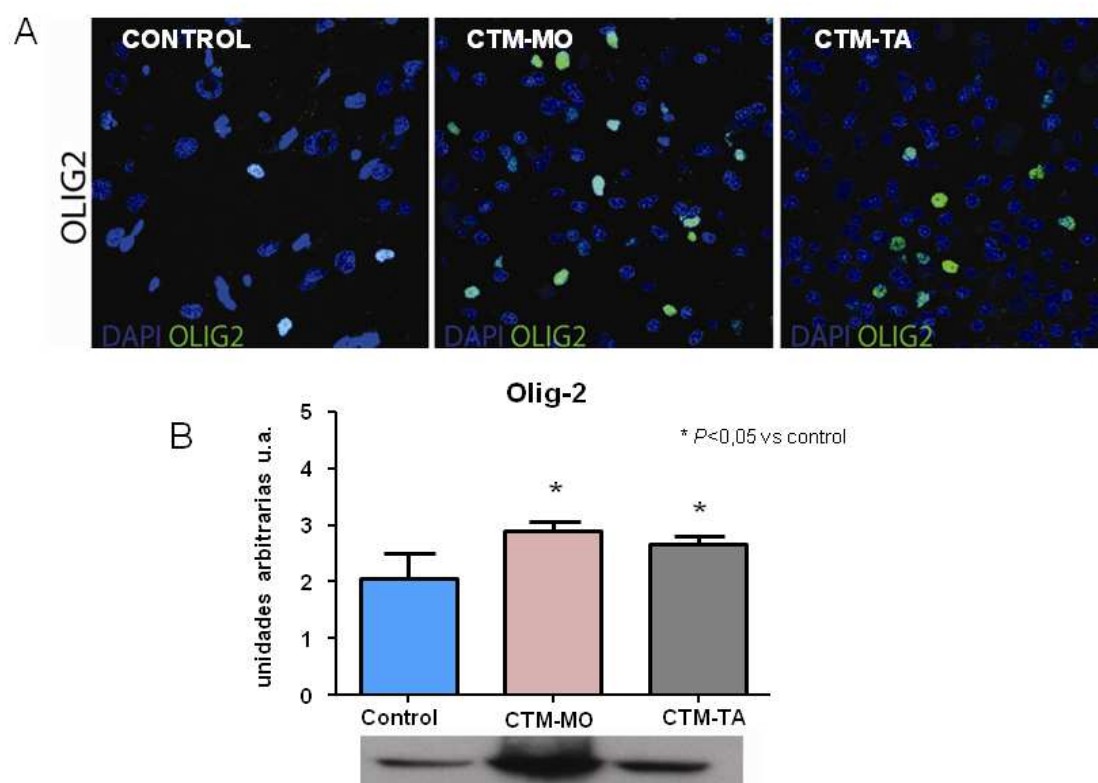


Figura 26. A. Imágenes de inmunofluorescencia de Olig-2 y DAPI en animales control y tratados en la zona de peri-infarto a los 14 días después del IC (40x). B. Cuantificación por Western blot de los niveles de Olig-2 en los grupos control y tratados. Se observó una mayor expresión de Olig-2 en los grupos de tratamiento con respecto al grupo control ($P < 0,05$). Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar.

4.5.4. Expresión del marcador SYP

Se analizó la expresión del marcador SYP en la zona de peri-infarto por inmunofluorescencia en los animales control y en los tratados con CTM-MO y CTM-TA a los 14 días después del IC. Para ello, se hicieron dobles marcajes con SYP y DAPI (40x). Todos los grupos de animales presentaban marcaje positivo en la zona de peri-infarto para estos dos marcadores (Figura 27A).

Al llevar a cabo la cuantificación de SYP en la zona de peri-infarto por Western blot se observó que la expresión de este marcador era significativamente mayor en los animales tratados CTM-MO ($3,14 \pm 0,16$) y CTM-TA ($3,06 \pm 0,15$) que en los animales control ($2,15 \pm 0,22$) a los 14 días después del IC ($P < 0,05$) (Figura 27B).

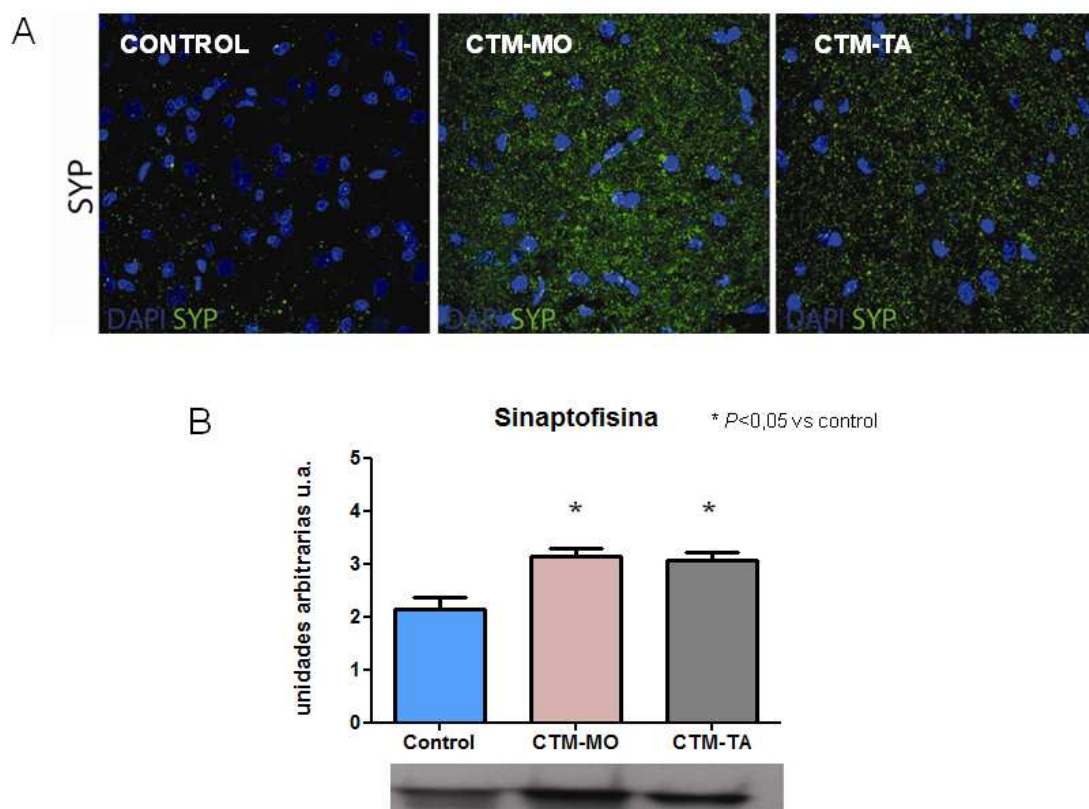


Figura 27. A. Imágenes de inmunofluorescencia de sinaptofisina (SYP) y DAPI en animales control y tratados en la zona de peri-infarto a los 14 días después del IC (40x). B. Cuantificación por Western Blot de los niveles de SYP en los grupos control y tratados. Se observó una mayor expresión de SYP en los grupos de tratamiento con respecto al grupo control ($P < 0,05$). Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar.

4.5.5. Expresión del marcador VEGF

Se analizó la expresión del marcador de VEGF en la zona de peri-infarto por inmunofluorescencia a los 14 días después del IC. Para ello, se realizaron triples marcajes con NeuN, VEGF y DAPI (40x) en todos los grupos y se observó que todos los animales presentaban marcaje positivo para estos tres marcadores en la zona de peri-infarto (Figura 28A).

Al llevar a cabo la cuantificación de VEGF en la zona de peri-infarto por Western blot, se observó que la expresión de este marcador era significativamente mayor en los animales tratados con CTM-MO ($4,84 \pm 0,89$) y CTM-TA ($5,05 \pm 1,16$) que en los animales control ($2,75 \pm 1,38$) ($P < 0,05$) a los 14 días después del IC (Figura 28B).

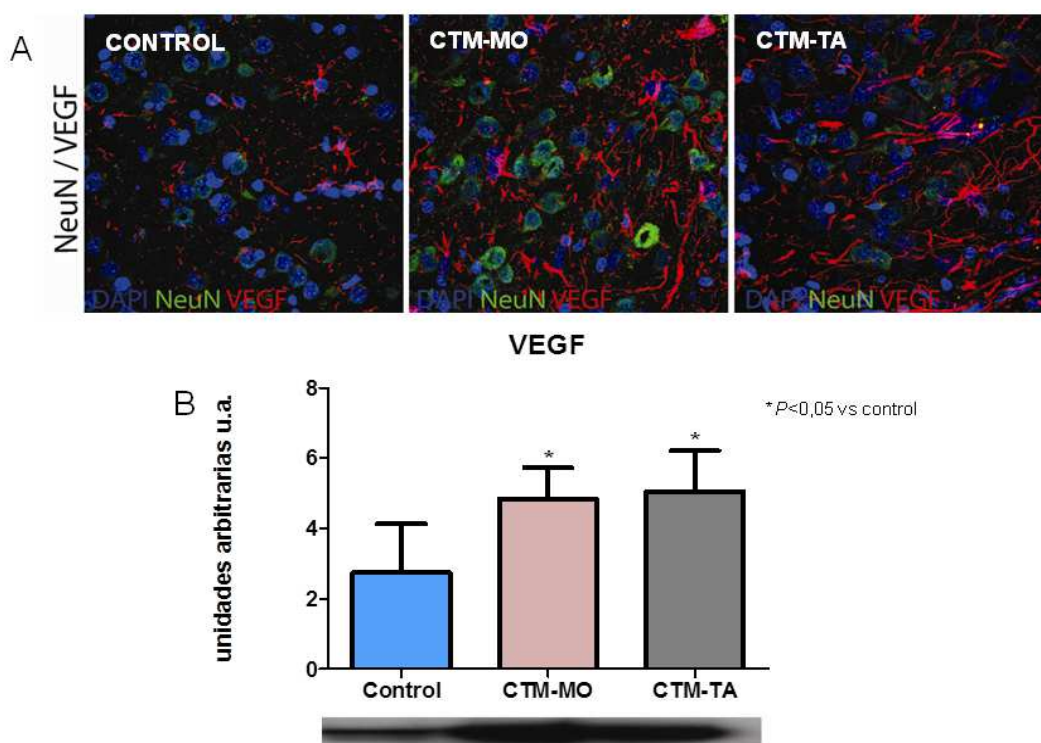


Figura 28. A. Imágenes de inmunofluorescencia de NeuN, VEGF y DAPI en animales control y tratados en la zona de peri-infarto a los 14 días después del IC (40x). B. Cuantificación por Western Blot de los niveles de VEGF en los grupos control y tratados. Se observó una mayor expresión de VEGF en los grupos de tratamiento con respecto al grupo control ($P < 0,05$). Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar.

DISCUSIÓN

Gracias al desarrollo de la investigación en IC, se conocen más los mecanismos patogénicos que acontecen a nivel celular y molecular durante la isquemia y reperusión del tejido isquémico, lo que ha permitido estudiar diversos abordajes terapéuticos. Es sabido que la actuación terapéutica precoz es muy importante para salvar la mayor cantidad de tejido viable y así, evitar la extensión del IC. Actualmente, el tratamiento reperfusor disponible no es suficientemente efectivo y no todos los pacientes pueden recibirlo debido a su estrecha ventana terapéutica y a sus múltiples contraindicaciones. Además, la mayoría de los fármacos que han sido ensayados como protectores cerebrales han fracasado y una de las razones ha sido porque estas terapias sólo iban dirigidas a salvar las células neurales. Sin embargo, el daño se produce en un complejo sistema celular, la llamada unidad neurovascular, por tanto es un daño de todo el órgano. Todo esto nos hace pensar que es necesario encontrar nuevas vías o terapias para los enfermos de IC.

En la actualidad se encuentran en investigación tratamientos orientados a favorecer la reparación cerebral, como la terapia celular. Esta terapia ha demostrado un efecto favorable en otras patologías como en la enfermedad injerto contra huésped y la osteogénesis imperfecta⁹³. En este sentido, se están realizando varios ensayos clínicos a nivel mundial con esta terapia para IC, aunque es necesario seguir profundizando en el estudio de aspectos relacionados con la elección del tipo celular, tiempo de inoculación, vía de administración o del rango de dosis óptima y de esta manera, poder identificar las mejores opciones para su traslación clínica.

1. RECUPERACIÓN FUNCIONAL E IMPLANTACIÓN DE LAS CTM ALOGÉNICAS EN EL INFARTO CEREBRAL AGUDO

Se compararon 2 vías de administración, i.c. e i.v., para determinar si ambas eran o no, igualmente eficaces en el tratamiento del IC. Con respecto a la escala de evaluación funcional se utilizó el test de Rogers basado en el comportamiento motor. Los resultados mostraron que ambas rutas fueron igualmente eficaces induciendo un

rápido efecto positivo sobre la recuperación funcional a las 24h y que continuó hasta los 14 días después de su administración. Estos resultados nos llevaron a considerar la vía i.v. como más idónea para la traslación clínica, ya que es menos invasiva que la i.c. o la implantación intracerebral. Hoy en día, la ruta de administración más adecuada no está definida, los métodos utilizados para la administración intracerebral de células troncales son los más invasivos y pueden ser utilizados en modelos animales pero son vías agresivas para los pacientes al tener que ser implantadas las células mediante técnica estereotáxica; por ello, en el presente estudio se decidió utilizar vías de administración menos invasivas, como las hemáticas, i.c. e i.v., pareciendo ésta última, la más apropiada para su traslación clínica. En este sentido, en un modelo de isquemia cerebral focal transitoria en ratas se administraban las células por vía i.c. e i.v. en fase aguda del IC pero sólo se analizaba la implantación y anidamiento de las células⁹⁴, mientras que en nuestro trabajo se quiso estudiar el posible efecto terapéutico protector y reparador que podían ejercer estas células administradas por vía i.c. e i.v. en un modelo de isquemia cerebral focal permanente.

Al comparar las dos fuentes celulares, CTM-MO y CTM-TA, con esta misma escala funcional se observó que ambas mostraron un efecto positivo sobre la recuperación funcional a las 24h continuando hasta los 14 días. Además, se llevó a cabo otra prueba funcional, el test de Rota-Rod⁹⁵ que evaluó la función motora, el equilibrio y la coordinación de la marcha tras OpACM⁹⁶. Al igual que el test de Rogers, también se observó una buena recuperación funcional tras la administración por vía i.v. de ambos tipos de CTM a las 24h y 14 días.

Sabemos que bajo condiciones de isquemia, las CTM pueden atravesar la BHE y migrar hacia el cerebro^{51, 52, 97} pudiendo ser atraídas por el tejido cerebral dañado. Los nichos que forman las células troncales juegan un papel importante en el mantenimiento y función celular, ya que están implicados en diversos procesos como son la interacción entre ellas, contacto con la matriz extracelular, niveles de oxígeno y pH, entre otros⁹⁸, formando un microambiente idóneo. Los resultados de nuestro

estudio mostraron implantación de CTM en la zona de lesión a las 24h y 14 días cuando las células eran administradas por la ruta i.c. Sin embargo, se observó escasa o nula llegada de células a la zona de la lesión con las técnicas de RM e inmunohistoquímica cuando la ruta de administración era i.v. Nuestros resultados coinciden con otros estudios, donde las células podrían migrar a la zona de la lesión^{99,100} pero llegarían en tan poca cantidad cuando se administran por vía i.v. que no se detectan. Así, en otro estudio en ratas que evaluó la migración celular, se observó que sólo un 1% de las células humanas de cordón umbilical inyectadas por vía i.v. tras una oclusión de la ACM fueron detectadas en el cerebro⁶⁷, observándose de nuevo buena recuperación funcional. Según diversos estudios, estas células se acumulaban en diferentes órganos principalmente en pulmón, hígado, bazo y riñón^{94,101-103}, no apreciándose efectos adversos. Por ello, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que no sería necesario que las células troncales migren ni formen nichos en la zona lesionada para obtener una buena recuperación funcional. Estos resultados estarían en consonancia con estudios que demuestran que la buena recuperación funcional podría estar mediada por la secreción de factores tróficos y citocinas¹⁰⁴ que ayudarían a proteger y reparar el tejido lesionado.

Durante muchos años se creía que las células troncales reemplazaban a las células dañadas y que la buena recuperación podría ser consecuencia de diversos efectos de las células; sin embargo, hoy en día no está totalmente explicado apuntándose tres teorías que podrían explicarlo, como son la transdiferenciación, fusión celular o actividad paracrina, mediante la liberación de factores tróficos⁷⁴. De todas ellas, en nuestra opinión sería la del efecto paracrino que ejercen las células troncales a través de la liberación o estimulación de factores tróficos, que se comentará más adelante.

Como se ha mencionado anteriormente, es poco probable que las células administradas puedan diferenciarse a estirpes neurales *in vivo*^{105,106}. Es cierto que el microambiente cerebral fomenta esta transdiferenciación pero se trata de un fenómeno

que ocurre con poca frecuencia. En el presente trabajo se realizaron estudios de co-marcajes de las CTM con Dil con diferentes marcadores neurales y se observó que a los 14 días en la zona de peri-infarto las CTM-MO administradas por vía i.c. co-marcaban con el marcador neuronal NF. Esto significa que algunas CTM que habían sido administradas se habían diferenciado después del daño a células de estirpe neuronal, pero en una proporción muy baja, como se observó en trabajos previos donde el número de CTM que se diferencian a células neurales era muy escaso en comparación con el número total de células administradas^{105,106}. Sin embargo, otros estudios reportan una transdiferenciación de CTM a diferentes tipos de células neurales *in vivo*^{107,108}. Además de co-marcar con NF, observamos una inmunoreactividad positiva con el marcador CD11, lo que podría indicar que parte de las CTM-MO administradas por vía i.c. que llegaron a la zona de la lesión a los 14 días fueron fagocitadas por macrófagos. El tejido isquémico presenta condiciones desfavorables para la supervivencia de las células administradas pudiendo sobrevivir muy pocas, ya que tras la lesión se activa la cascada de muerte celular¹⁰⁹. Así por ejemplo, entre un 70-90% de neuronas dopaminérgicas implantadas en el estriado mueren un día después de su administración^{110,111} debido al ambiente generado tras la isquemia cerebral.

Otro mecanismo que podría contribuir a la recuperación funcional sería la fusión espontánea entre las células administradas y células huéspedes. Diversos estudios han examinado episodios espontáneos de fusión celular donde muestran que las células híbridas podrían adquirir rasgos fenotípicos de las receptoras^{112,113}, pero este fenómeno ocurre con poca frecuencia.

Por último, la teoría que nos parece más interesante en base a los resultados encontrados en nuestro estudio, sería la de la secreción de factores tróficos por parte de las CTM como NGF (factor de crecimiento nervioso), BDNF, VEGF, bFGF (factor de crecimiento de fibroblasto básico), entre otros, al igual que una variedad de citocinas como IL-6, IL-11, IL-12, IL-1, entre otras¹⁰⁴. Este efecto paracrino que

ejercerían las CTM sobre la estimulación y liberación de factores tróficos sería el causante de su efecto sobre la plasticidad cerebral tras el daño tisular, promoviendo mecanismos de reparación como neurogénesis, oligodendrogénesis, sinaptogénesis, remodelación axonal y angiogénesis.

2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CTM ALOGÉNICAS POR VÍA HEMÁTICA TRAS INFARTO CEREBRAL AGUDO. MECANISMOS DE ACCIÓN.

Son ampliamente conocidos los efectos beneficiosos que ejercen las CTM sobre la recuperación estructural y funcional en modelos animales^{51,55,70}. A pesar de todas estas ventajas, los mecanismos de acción por los que las CTM ejercen efectos protectores y reparadores en el IC son aún desconocidos. En este trabajo se estudiaron los efectos de la administración por vía hemática de CTM-MO y CTM-TA alogénicas en la recuperación funcional tras el infarto cerebral, analizando los mecanismos que intervienen en la misma.

2.1. Tamaño de lesión, muerte y proliferación celular

Hemos observado cómo el tratamiento con CTM independientemente de la vía de administración (i.v. e i.c.) y la fuente celular (CTM-MO y CTM-TA) no reducía el tamaño de lesión ni a las 24h ni a los 14 días. Otros estudios experimentales en animales si han encontrado la reducción de ésta^{70,114-119}, pero usando distintos modelos de IC, diferentes tiempos de administración y otras dosis de células. Otros estudios en animales han encontrado que tras la administración de CTM-MO entre 3 y 24h después de OACM se reducía aproximadamente en un 50% el número de células apoptóticas en la penumbra isquémica¹²⁰⁻¹²², esta disminución podría estar acompañada de un aumento en la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 y survivina después del tratamiento con CTM¹²¹, así como la actividad de la caspasa-3 y el ratio de Bax/Bcl-2¹²³.

Por otro lado, observamos un aumento de proliferación celular en la zona de peri-infarto en los animales tratados con CTM-MO y CTM-TA respecto a los animales control. A todos los animales se les administró BrdU por vía i.p. entre los días 4 y 7 después del IC. Esta administración se ha basado en estudios previos donde se dice que la máxima proliferación celular se alcanza entre los 4-10 días después del daño cerebral^{124,125}. Posteriormente, a los 14 días se llevaron a cabo co-marcajes de BrdU con varios marcadores neurales, observando que sólo alguna célula BrdU positiva co-marcaba con GFAP y NF en animales tratados con CTM-MO y CTM-TA. Las células troncales neurales son capaces de renovarse y generar tanto células neuronales como gliales¹²⁶. Nuestros resultados mostraron que las pocas células que habían proliferado en la zona de peri-infarto después de la lesión tisular se habían diferenciado a la estirpe glial y neuronal.

2.2. Citocinas pro-inflamatorias

La inflamación se caracteriza por la acumulación de células inflamatorias y mediadores en el cerebro isquémico. Las células neurales producen citocinas, quimiocinas y pueden expresar moléculas de adhesión que permiten una reacción inflamatoria *in situ*. En roedores se observó que tras una oclusión transitoria de la arteria cerebral media (OtACM), se encontraron sobre-expresados genes inflamatorios a las pocas horas del IC y elevados en días posteriores^{127,128}. Por ejemplo, la expresión de IL-6 se incrementó significativamente en la fase aguda del IC¹²⁹ y permaneció elevada en neuronas y microglía reactiva en la zona de penumbra hasta los 14 días después del daño cerebral¹³⁰.

Se analizaron las citocinas inflamatorias a los 14 días para comprobar si seguían elevadas después del daño por OpACM, mostrándose altos niveles plasmáticos de citocinas en el grupo CTM-MO i.v. con respecto al grupo CTM-MO i.c. a los 14 días, aunque sólo se observaron diferencias significativas al medir la citocina IL-6. Además, como se ha comentado anteriormente, cuando se administran las células por vía i.v.

se acumulan en diversos órganos^{94,101-103}, lo que podría estar relacionado con una respuesta sistémica tras su administración. Sin embargo, se observó la misma buena recuperación funcional en ambos grupos de tratamiento. Por otro lado, el incremento de los niveles de ambas citocinas en el grupo control i.c. en comparación con el grupo control i.v. podría ser debido a que la cirugía carotídea es más agresiva que la femoral, produciendo un mayor daño endotelial. Estos datos sugieren que la liberación de citocinas no identifica la mejor vía de administración, ya que se observa una buena recuperación funcional y disminución de daño cerebral por ambas vías. Cuando se analizaron las mismas citocinas pro-inflamatorias en plasma a los 14 días en los animales tratados con CTM-TA por vía i.v., se observaron unos resultados similares a los animales tratados con CTM-MO i.v. Tanto, IL-6 como TNF-alpha estaban incrementadas en los dos grupos de terapia celular por vía i.v. con respecto a los animales control.

Las células troncales juegan un papel dual en la regulación de la cascada inflamatoria mediante la producción de citocinas y factores de crecimiento, observándose una inflamación exacerbada tras su administración¹³¹, por ello, la modulación de la producción de éstas podría presentar un mecanismo de protección¹³². La implantación de CTM cerca del sitio de la lesión activa los nichos de las CTN residentes, modificando las condiciones del medio en el cerebro y evitando la apoptosis, causada por el incremento de la producción de IL-6¹³². Por tanto, respuestas inflamatorias tempranas parecen contribuir a fomentar el daño isquémico, mientras que respuestas tardías podrían corresponder con una buena recuperación y la activación de mecanismos de reparación¹³³. Así que, aunque las CTM modulan la respuesta inmune, los mecanismos siguen siendo poco conocidos.

2.3. Mecanismos de reparación cerebral

Como consecuencia del IC, queda comprometida la integridad de la unidad neurovascular, formada por neuronas, astrocitos, microvasos, pericitos y células de

soporte, como los oligodendrocitos, lo que convierte a ésta en una posible diana terapéutica. Tras el ictus isquémico, una serie de mecanismos protectores y reparadores pueden ser potenciados mediante la administración de células troncales. Aunque cada vez es más evidente el efecto beneficioso de las CTM en modelos animales, los mecanismos de acción que están detrás de esa buena recuperación funcional son hasta la fecha poco conocidos.

Durante muchos años se pensó que las células troncales administradas reemplazaban a las células dañadas. Sin embargo, diferentes estudios mostraron que las células troncales favorecían la reparación de los tejidos dañados mediante señales que estimulaban tanto a las células dañadas como a las sanas, potenciando los mecanismos de protección y reparación cerebral²⁶. Las CTM se comportan como pequeñas factorías moleculares encargadas de secretar citoquinas, factores de crecimiento y otros factores solubles^{66,134} ejerciendo una función paracrina y en estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que estos factores son capaces de promover la proliferación, supervivencia y diferenciación celular⁷⁴, de hecho, muchos de los factores secretados por las CTM como BDNF, NGF, neurotrofina 3, VEGF, factor de crecimiento ciliar (CNTF) y bFGF entre otros, son capaces de ejercer efectos neurogénicos sobre las células progenitoras neurales^{135,136}. Por otra parte, estas células liberan una amplia variedad de interleucinas como IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14 e IL-15¹⁰⁴. Por tanto, podemos decir que las células del tejido dañado expresan factores tróficos y de crecimiento según las necesidades tisulares. Los efectos que ejercen estos factores están asociados a mecanismos de plasticidad cerebral y serían protectores (disminución de la muerte celular), neurogénicos (formación de estirpes neurales), sinaptogénicos (formación de sinapsis y contactos sinápticos), angiogénicos (formación de nuevos vasos sanguíneos) e inhibidores de la cicatriz glial⁶⁶.

Existe una neurogénesis adulta en la zona subgranular del hipocampo, ZSV y bulbo olfatorio^{137,138}, tanto en cerebros sanos como en aquellos que han sufrido un daño¹³⁸⁻¹⁴¹. Tras el IC se ha observado un incremento de neuroblastos, sin embargo,

aproximadamente un 80% de éstos mueren antes de formar neuronas maduras y sólo un 0,2 % de las neuronas que mueren tras el daño son reemplazadas¹⁴². Después de un IC, los neuroblastos generados en la ZSV migran hacia la zona de peri-infarto y esta migración está estrechamente relacionada con los vasos cerebrales^{28,143}. La angiogénesis tras la isquemia cerebral es un hecho constatado que podría interpretarse como un mecanismo para restablecer el aporte de oxígeno al área cerebral afectada³⁰. Nosotros hemos analizado los niveles de expresión de VEGF, factor de crecimiento involucrado en procesos de angiogénesis y vasculogénesis^{144, 145} y que se encuentra regulado por la concentración de oxígeno local e hipoxia que incrementa su expresión¹⁴⁶. En condiciones normales se expresa en todo el tejido cerebral, sin embargo lo hace de manera más significativa en el plexo coroideo, aunque también en neuronas y astrocitos^{147,148}. Pocos días después de un IC se produce un aumento de vascularización en la zona de peri-infarto¹⁴⁹ que se ha relacionado con una buena recuperación funcional¹⁵⁰. Cuando se administraron las CTM-MO por rutas hemáticas (i.v. e i.c.) observamos un aumento de la expresión de VEGF en la zona peri-infarto con respecto a los animales control y lo mismo ocurrió cuando se administraron por vía i.v. los dos tipos celulares, CTM-MO y CTM-TA. Estos resultados se encuentran en consonancia con otros estudios que también encuentran un aumento de este factor tras la administración de células troncales^{66,120,151-154}. Por otro lado, existen estudios que observaron que la administración i.v. e intramuscular de CTM-TA mejoraba significativamente el flujo sanguíneo, probablemente debido a la diferenciación de éstas a células endoteliales y de manera indirecta por la secreción de factores de crecimiento que promueven la vascularización^{155,156}.

La recuperación después del IC es un proceso dinámico¹⁵⁷. La plasticidad sináptica está relacionada con cambios en el comportamiento y en la recuperación funcional tras el daño cerebral¹⁵⁸ y con el incremento en la densidad de espinas dendríticas, que son estrategias morfológicas que permiten la organización de los circuitos neuronales en el cerebro¹⁵⁹. Tras un IC la actividad sináptica se incrementa en la zona de alrededor de

la lesión, observándose un aumento de la expresión de SYP en la zona de peri-infarto¹⁶⁰. Además, la producción de factores tróficos y de crecimiento producidos por las CTM estimulan la sinaptogénesis e incrementan la arborización dendrítica. En nuestro estudio observamos incremento de SYP en la zona de peri-infarto a los 14 días en todos los animales que han sido sometidos a OpACM con un aumento en aquellos animales tratados con ambos tipos celulares de CTM, en comparación con los animales control.

Los oligodendrocitos son uno de los tipos celulares que forman la sustancia blanca, produciendo la mielina que envuelve a los axones. Tras la isquemia cerebral los oligodendrocitos son vulnerables^{161,162} causando pérdida de mielinización del tejido lesionado. Oligodendrogénesis y remielinización de áreas desmielinizadas son potenciadas tras la administración de CTM-MO después de un IC^{163,164}. Por otro lado, la administración i.v. de CTM-TA ha mostrado una mejoría en la función motora después del daño tisular. Por otra parte, algunas de las células administradas se diferencian a neuronas y oligodendrocitos¹⁶⁵. Nuestros hallazgos mostraron un aumento significativo del marcador de oligodendrogénesis, Olig-2, en los animales tratados con CTM-MO y CTM-TA con respecto a los animales control en la zona de peri-infarto a los 14 días, lo cual iría a favor de favorecer la mielinización en esa zona.

En este contexto, neurogénesis, oligodendrogénesis, sinaptogénesis y angiogénesis son mecanismos reparadores interrelacionados, que son activados tras el IC. Todos estos mecanismos son potenciados tras la administración de las CTM, tanto las procedentes de médula ósea como las de tejido adiposo, debido en mayor parte, a la secreción de factores tróficos.

Con respecto a la gliogénesis, no está claro si el incremento de GFAP puede resultar beneficioso o no, aunque los astrocitos juegan un papel importante en el remodelamiento cerebral tras la isquemia, también es cierto que la gliosis puede ser un impedimento para el crecimiento de las neuritas y la arborización dendrítica después de un IC¹⁶⁶. Nosotros encontramos que la expresión de este marcador se

encuentra disminuido en la zona de peri-infarto en los animales tratados con ambos tipos celulares con respecto a los animales control a los 14 días y esto podría estar relacionado con la formación de una menor cicatriz glial. Estos hallazgos están en consonancia con estudios previos en ratas, donde se observó que tras la administración de CTM-TA, se produce una disminución en la expresión de GFAP y, por tanto, una menor gliosis⁷⁰, al igual que se reduce la cicatriz glial tras la administración de CTM-MO¹⁶⁴.

NF es el elemento del citoesqueleto más abundante encontrado en los axones y dendritas¹⁶⁷. Después de la isquemia cerebral focal, los niveles de expresión génica y proteica de NF estaban incrementados en la zona alrededor del IC¹⁶⁸. Además, en un estudio experimental en ratas sometidas a OACM, se apreció un incremento de axones en la zona de peri-infarto así como en su área homóloga en la corteza contralateral durante la recuperación funcional, sugiriendo que el IC induce crecimiento axonal *de novo* junto a un incremento de la mielinización¹⁶⁹ que se ve favorecido tras la administración i.v. de CTM-MO, estimulando la plasticidad axonal¹⁷⁰. También hemos observado un aumento de la expresión de este marcador neuronal en aquellos animales que habían recibido tratamiento con CTM-MO y CTM-TA en comparación con los animales control, lo que significaría un estímulo de plasticidad de fibras.

Con respecto a BDNF, ha sido ampliamente estudiado en el tejido cerebral en modelos animales de IC. Trabajos previos mostraron que los niveles de este factor trófico estaban incrementados¹⁷¹⁻¹⁷³, sugiriendo que promueve la plasticidad tisular después de la lesión^{172,174}. Estos resultados están en línea con los nuestros, donde observamos que se produce un aumento de este marcador en la zona de peri-infarto a los 14 días después de la lesión. Este incremento es producido por el infarto en sí, ya que se observó en todos los animales sometidos a OpACM, mostrándose una ligera tendencia al aumento de este factor en los animales tratados con CTM pero sin diferencias significativas con respecto al grupo control.

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio observamos que la administración por vía hemática de CTM alogénicas en IC agudo contribuye a potenciar los mecanismos de protección y reparación precozmente, disminuyendo el daño cerebral y mejorando la recuperación funcional de los animales. Ambas rutas de administración y ambas fuentes celulares de CTM son igualmente eficaces sobre la recuperación funcional. Además, la administración durante la fase aguda podría inhibir los primeros pasos de la cascada isquémica potenciando los mecanismos de protección y reparación cerebral^{175,176}. No obstante, sería conveniente profundizar en el estudio de mediadores moleculares y celulares de inmunomodulación, protección, acciones tróficas, vascularización y remodelación axonal inducidos tras la administración de CTM por vía hemática. De todas las vías y tipo celular, la vía i.v. (menos invasiva) y las CTM-TA (estirpe celular de fácil accesibilidad) serían las más apropiadas para su traslación a la clínica.

Nuestras investigaciones en terapia celular en modelos animales experimentales ha sido la base para la puesta en marcha de un ensayo clínico, AMASCIS-01 (NCT01678534)⁸⁰, piloto unicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo con el objetivo de analizar la seguridad de la administración i.v. de CTM alogénicas procedentes de tejido adiposo de donante sano en los pacientes con IC de menos de dos semanas de evolución, de ese modo, una vez demostrada la seguridad debería investigarse su potencial eficacia en futuros ensayos en fase III.

CONCLUSIONES

En un modelo experimental en ratas de infarto cerebral agudo por oclusión permanente de la arteria cerebral media observamos:

1. La administración de células troncales mesenquimales alogénicas tanto por vía intracarotídea como intravenosa, es eficaz en la recuperación funcional.
2. El tratamiento con células troncales mesenquimales alogénicas procedentes de tejido adiposo es tan eficaz como las procedentes de médula ósea para favorecer la recuperación funcional.
3. La administración por vía hemática de células troncales mesenquimales alogénicas derivadas de médula ósea y tejido adiposo favorecen la recuperación funcional al potenciar mecanismos protectores (disminución de muerte celular y de gliosis) y reparadores (aumento de proliferación celular y expresión de marcadores implicados en neurogénesis, oligodendrogénesis, sinaptogénesis y angiogénesis) de la lesión cerebral.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Arboix A, Álvarez-Sabin J, Soler L, en nombre del Comité de Redacción ad hoc del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN. Ictus. Clasificación y criterios diagnósticos. *Neurología*. 1998;13(Suppl 3):3—10.
2. Luengo-Fernandez R, Gray AM, Rothwell PM. Costs of stroke using patient-level data: a critical review of the literature. *Stroke*. 2009;40: e18-23.
3. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte 2009. www.ine.es. Mayo 2013.
4. Díaz-Guzman J, Egido JA, Gabriel-Sánchez R, Barbera-Comes G, Fuentes-Gimeno B, Fernández-Pérez C; IBERICTUS Study Investigators of the Stroke Project of the Spanish Cerebrovascular Diseases Study Group. Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: the IBERICTUS study. *Cerebrovasc Dis*. 2012;34: 272-81.
5. Arias-Rivas S, Vivancos-Mora J, Castillo J; En Nombre de Los Investigadores Del Registro Epices. Epidemiología de los subtipos de ictus en pacientes hospitalizados atendidos por neurologos: resultados del registro EPICES (I). *Rev Neurol*. 2012;54: 385-93.
6. Alvarez Sabín J, Alonso de Leciñana M, Gallego J, Gil-Peralta A, Casado I, Castillo J, Díez Tejedor E, Gil A, Jiménez C, Lago A, Martínez-Vila E, Ortega A, Rebollo M, Rubio F. Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. Plan de atención sanitaria al ictus. *Neurología*. 2006;21: 717-26.
7. Pulsinelli W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet*. 1992;339: 533-6.
8. Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke*. 1977;8: 51-7.
9. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12: 723-5.
10. Baron JC. Mapping the ischaemic penumbra with PET: a new approach. *Brain*. 2001;124: 2-4.
11. Heiss WD, Kracht LW, Thiel A, Grond M, Pawlik G. Penumbra probability thresholds of cortical flumazenil binding and blood flow predicting tissue outcome in patients with cerebral ischaemia. *Brain*. 2001;124: 20-9.
12. Gutiérrez-Fernández M, Alonso de Leciñana M. Cerebroprotección. En Barinagarrementeria F, Arauz A Eds. *Temas selectos en Enfermedad Vascular Cerebral*. Elsevier. 2012: 59-67.
13. Ramos-Cejudo J, Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Expósito Alcaide M, Sánchez-Cabo F, Dopazo A, Díez-Tejedor E. Spatial and temporal gene expression differences in core and periinfarct areas in experimental stroke: a microarray analysis. *PLoS One*. 2012;7: e52121.
14. Ramos-Cabrera P, Campos F, Sobrino T, Castillo J. Targeting the ischemic penumbra. *Stroke*. 2011;42 (Suppl 1): S7-11.
15. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg*. 1992;77: 337-54.
16. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg*. 1992;77: 169-84.

17. García JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*. 1995;26: 627-34.
18. Touzani O, Roussel S, MacKenzie ET. The ischaemic penumbra. *Curr Opin Neurol*. 2001;14: 83-8.
19. Murayama S, Bouldin TW, Suzuki K. Selective sparing of Betz cells in primary motor area in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Neuropathol*. 1990;80: 560-2.
20. Mohr JP, Martí-Vilalta JL. Lacunes. En: Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM. Eds. *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Eds Stroke. New York: Churchill Livingstone; 1998: 599-622.
21. Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol*. 1996;6: 667-72.
22. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995;146: 3-15.
23. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*. 2002;31: 214-23.
24. Díez-Tejedor E, Alonso de Leciñana M. Fisiopatología de la isquemia cerebral. El daño de isquemia-reperusión. En Barinagarrementeria F, Cantú C Eds. *Enfermedad vascular cerebral* Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. 1998: 13-27.
25. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4: 399-415.
26. Gutiérrez M, Merino JJ, Alonso de Leciñana M, Díez-Tejedor E. Cerebral protection, brain repair, plasticity and cell therapy in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27 (Suppl 1): 177-86.
27. Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol*. 2002;52: 802-13.
28. Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*. 2006;26: 13007-16.
29. Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke*. 2007;38: 3032-9.
30. Brea D, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J. Reorganizacion de la vascularizacion cerebral tras la isquemia. *Rev Neurol*. 2009;49: 645-54.
31. Evans GJ, Cousin MA. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochem Soc Trans*. 2005;33: 1350-3.
32. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19: 312-8.
33. Zhang H, Muramatsu T, Murase A, Yuasa S, Uchimura K, Kadomatsu K. N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 is required for brain keratan sulfate biosynthesis and glial scar formation after brain injury. *Glycobiology*. 2006;16: 702-10.
34. Johansson BB. Current trends in stroke rehabilitation. A review with focus on brain plasticity. *Acta neurologica Scandinavica*. 2011;123: 147-59.
35. Chopp M, Li Y, Zhang ZG. Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. *Stroke*. 2009;40 (Suppl 3): S143-5.

36. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008;359: 1317-29.
37. Pulsinelli WA. The therapeutic window in ischemic brain injury. *Curr Opin Neurol*. 1995;8: 3-5.
38. de Romo AC. Chance, creativity, and the discovery of the nerve growth factor. *J Hist Neurosci*. 2007;16: 268-87.
39. del Zoppo GJ. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2009;158: 972-82.
40. Hurtado O, Pradillo JM, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Sobrino T, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2006;21 (Suppl 2): 54-63.
41. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke*. 2007;38 (Suppl 2): 817-26.
42. Rabin M, Ferguson-Smith A, Hart CP, Ruddle FH. Cognate homeo-box loci mapped on homologous human and mouse chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83: 9104-8.
43. Purves MJ. The physiology of the cerebral circulation. *Monogr Physiol Soc*. 1972; 1-414.
44. Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernandez P, Pascual-Garvi JM, Matías-Guiu J, Roda JM, Barcia-Albacar JA. Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Rev Neurol*. 2008;47: 414-26.
45. Alonso de Leciñana M, Díez-Tejedor E, Gutiérrez M, Guerrero S, Carceller F, Roda JM. New goals in ischemic stroke therapy: the experimental approach--harmonizing science with practice. *Cerebrovasc Dis*. 2005;20 (Suppl 2): 159-68.
46. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1981;1: 61-9.
47. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*. 1986;17: 738-43.
48. Liu TH, Beckman JS, Freeman BA, Hogan EL, Hsu CY. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol*. 1989;256: H589-93.
49. Roda JM, Carceller F, Díez-Tejedor E, Avendaño C. Reduction of infarct size by intra-arterial nimodipine administered at reperfusion in a rat model of partially reversible brain focal ischemia. *Stroke*. 1995;26: 1888-92.
50. Avendaño C, Roda JM, Carceller F, Díez-Tejedor E. Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. *Brain research*. 1995;673: 83-92.
51. van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Regeneration of the ischemic brain by engineered stem cells: fuelling endogenous repair processes. *Brain Res Rev*. 2009;61: 1-13.
52. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2001;32: 1005-11.

53. Shen LH, Li Y, Chen J, Zhang J, Vanguri P, Borneman J, Chopp M. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience*. 2006;137: 393-9.
54. Shen LH, Li Y, Chen J, Cui Y, Zhang C, Kapke A, Lu M, Savant-Bhonsale S, Chopp M. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke*. 2007;38: 2150-6.
55. Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Zhang Z. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20: 1311-9.
56. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105: 1815-22.
57. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31: 890-6.
58. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004;32: 414-25.
59. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbai M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005;129: 118-29.
60. Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci*. 2001;189: 49-57.
61. Jin K, Sun Y, Xie L, Mao XO, Childs J, Peel A, Logvinova A, Banwait S, Greenberg DA. Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiol Dis*. 2005;18: 366-74.
62. Mitkari B, Kerkela E, Nystedt J, Korhonen M, Mikkonen V, Huhtala T, Jolkkonen J. Intra-arterial infusion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells results in transient localization in the brain after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol*. 2013;239: 158-62.
63. Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N, Nagata I. Intra-arterial Cell Transplantation Provides Timing-Dependent Cell Distribution and Functional Recovery After Stroke. *Stroke*. 2013;44: 720-6.
64. Iihoshi S, Honmou O, Houkin K, Hashi K, Kocsis JD. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res*. 2004;1007: 1-9.
65. Danielyan L, Schafer R, von Ameln-Mayerhofer A, Buadze M, Geisler J, Klopfer T, Burkhardt U, Proksch B, Verleysdonk S, Ayturan M, Buniatian GH, Gleiter CH, Frey WH II. Intranasal delivery of cells to the brain. *Eur J Cell Biol*. 2009;88: 315-24.
66. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol*. 2002;1: 92-100.
67. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*. 2001;32: 2682-8.

68. Bacigaluppi M, Pluchino S, Martino G, Kilic E, Hermann DM. Neural stem/precursor cells for the treatment of ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2008;265: 73-7.
69. Li Y, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2009;456: 120-3.
70. Leu S, Lin YC, Yuen CM, Yen CH, Kao YH, Sun CK, Yip HK. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats. *J Transl Med.* 2010;8: 63.
71. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284: 143-7.
72. Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000;164: 247-56.
73. Prockop DJ, Azizi SA, Colter D, Digirolamo C, Kopen G, Phinney DG. Potential use of stem cells from bone marrow to repair the extracellular matrix and the central nervous system. *Biochem Soc Trans.* 2000;28: 341-5.
74. Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem Int.* 2011;59: 347-56.
75. Yang M, Wei X, Li J, Heine LA, Rosenwasser R, Iacovitti L. Changes in host blood factors and brain glia accompanying the functional recovery after systemic administration of bone marrow stem cells in ischemic stroke rats. *Cell transplantation.* 2010;19: 1073-84.
76. Otero L, Zurita M, Bonilla C, Aguayo C, Vela A, Rico MA, Vaquero J. Late transplantation of allogeneic bone marrow stromal cells improves neurologic deficits subsequent to intracerebral hemorrhage. *Cytotherapy.* 2011;13: 562-71.
77. van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. *Brain Behav Immun.* 2010;24: 387-93.
78. Hess DC, Borlongan CV. Cell-based therapy in ischemic stroke. *Expert Rev Neurother.* 2008;8: 1193-201.
79. Suárez-Monteagudo C, Hernández-Ramírez P, Alvarez-González L, García-Maeso I, de la Cuétara-Bernal K, Castillo-Díaz L, Bringas-Vega ML, Martínez-Aching G, Morales-Chacón LM, Báez-Martín MM, Sánchez-Catasús C, Carballo-Barreda M, Rodríguez-Rojas R, Gómez-Fernández L, Alberti-Amador E, Macías-Abraham C, Balea ED, Rosales LC, Del Valle Pérez L, Ferrer BB, González RM, Bergado JA. Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients. An open study. *Restor Neurol Neurosci.* 2009;27: 151-61.
80. <http://clinicaltrials.gov/>.
81. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol.* 2005;57: 874-82.
82. Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells.* 2010;28: 1099-106.
83. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cell research in stroke: how far from the clinic? *Stroke.* 2011;42: 2369-75.

84. Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS): bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke. *Stroke*. 2009;40: 510-5.
85. Savitz SI, Chopp M, Deans R, Carmichael ST, Phinney D, Wechsler L. Stem Cell Therapy as an Emerging Paradigm for Stroke (STEPS) II. *Stroke*. 2011; 42: 825-9.
86. Prieto R, Carceller F, Roda JM, Avendaño C. The intraluminal thread model revisited: rat strain differences in local cerebral blood flow. *Neurol Res*. 2005;27:47-52.
87. Alonso de Leciñana M. Modelo experimental de infarto cerebral embólico en ratas. Efecto de trombolisis con rtPA i.v. y de neuroprotección por bloqueo de canales de calcio con lacidipino. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid;1999.
88. Alonso de Leciñana M, Gutiérrez M, Roda JM, Carceller F, Díez-Tejedor E. Effect of combined therapy with thrombolysis and citicoline in a rat model of embolic stroke. *J Neurol Sci*. 2006;247: 121-9.
89. Rogers DC, Campbell CA, Stretton JL, Mackay KB. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*. 1997;28: 2060-5.
90. Tsai LK, Wang Z, Munasinghe J, Leng Y, Leeds P, Chuang DM. Mesenchymal stem cells primed with valproate and lithium robustly migrate to infarcted regions and facilitate recovery in a stroke model. *Stroke*. 2011;42: 2932-9.
91. Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood*. 2004;104: 1217-23.
92. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119: 493-501.
93. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007;211: 27-35.
94. Walczak P, Zhang J, Gilad AA, Kedziorek DA, Ruiz-Cabello J, Young RG, Pittenger MF, van Zijl PC, Huang J, Bulte JW. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke*. 2008;39: 1569-74.
95. Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)*. 1957;46: 208-9.
96. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2001;Chapter 8: Unit 8.12.
97. Eglitis MA, Dawson D, Park KW, Mouradian MM. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport*. 1999;10: 1289-92.
98. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004;116: 769-78.
99. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*. 2002;59: 514-23.
100. Song CH, Honmou O, Ohsawa N, Nakamura K, Hamada H, Furuoka H, Hasebe R, Horiuchi M. Effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. *J Virol*. 2009;83: 5918-27.

101. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*. 2001;169: 12-20.
102. Pendharkar AV, Chua JY, Andres RH, Wang N, Gaeta X, Wang H, De A, Choi R, Chen S, Rutt BK, Gambhir SS, Guzman R. Biodistribution of neural stem cells after intravascular therapy for hypoxic-ischemia. *Stroke*. 2010;41: 2064-70.
103. Steiner B, Roch M, Holtkamp N, Kurtz A. Systemically administered human bone marrow-derived mesenchymal stem home into peripheral organs but do not induce neuroprotective effects in the MCAo-mouse model for cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 2012;513: 25-30.
104. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2007;25: 2025-32.
105. Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells*. 2006;24:1054-64.
106. Deng YB, Liu XG, Liu ZG, Liu XL, Liu Y, Zhou GQ. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys. *Cytotherapy*. 2006;8: 210-4.
107. Lu J, Moomchala S, Moore XL, Ng KC, Tan MH, Lee LK, He B, Wong MC, Ling EA. Adult bone marrow cells differentiate into neural phenotypes and improve functional recovery in rats following traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 2006;398: 12-7.
108. Muñoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci*. 2004;24: 4585-95.
109. Wei L, Keogh CL, Whitaker VR, Theus MH, Yu SP. Angiogenesis and stem cell transplantation as potential treatments of cerebral ischemic stroke. *Pathophysiology*. 2005;12: 47-62.
110. Brundin P, Barbin G, Isacson O, Mallat M, Chamak B, Prochiantz A, Gage FH, Björklund A. Survival of intracerebrally grafted rat dopamine neurons previously cultured in vitro. *Neurosci Lett*. 1985;61: 79-84.
111. Zawada WM, Zastrow DJ, Clarkson ED, Adams FS, Bell KP, Freed CR. Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats. *Brain Res*. 1998;786: 96-103.
112. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002;416: 542-5.
113. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002;416: 545-8.
114. Nomura T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience*. 2005;136: 161-9.
115. Horita Y, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human

- mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat. *J Neurosci Res*. 2006;84: 1495-504.
116. Ukai R, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia. *J Neurotrauma*. 2007;24: 508-20.
 117. Onda T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28: 329-40.
 118. Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, Suh-Kim H. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med*. 2008;40: 387-97.
 119. Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi S, Mizuno H, Tawada M, You F, Yamada K, Tanaka Y, Egashira Y, Nakashima S, Yoshimura S, Iwama T. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. *Cytotherapy*. 2011;13: 675-85.
 120. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Gautam SC, Chopp M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res*. 2003;73: 778-86.
 121. Okazaki T, Magaki T, Takeda M, Kajiwaraya Y, Hanaya R, Sugiyama K, Arita K, Nishimura M, Kato Y, Kurisu K. Intravenous administration of bone marrow stromal cells increases survivin and Bcl-2 protein expression and improves sensorimotor function following ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 2008;430: 109-14.
 122. Zhang C, Li Y, Chen J, Gao Q, Zacharek A, Kapke A, Chopp M. Bone marrow stromal cells upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, gap junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neuroscience*. 2006;141: 687-95.
 123. Li D, Fang Y, Wang P, Shan W, Zuo Z, Xie L. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury through suppressing apoptosis and inducible nitric oxide synthase. *International journal of molecular medicine*. 2012;29: 848-54.
 124. Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Batteur S, Simon RP, Greenberg DA. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98: 4710-5.
 125. Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*. 2001;32: 1890-6.
 126. Taupin P. The therapeutic potential of adult neural stem cells. *Curr Opin Mol Ther*. 2006;8: 225-31.
 127. Soriano MA, Tessier M, Certa U, Gill R. Parallel gene expression monitoring using oligonucleotide probe arrays of multiple transcripts with an animal model of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20: 1045-55.
 128. Lu XC, Williams AJ, Yao C, Berti R, Hartings JA, Whipple R, Vahey MT, Polavarapu RG, Woller KL, Tortella FC, Dave JR. Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion. *J Neurosci Res*. 2004;77: 843-57.

129. Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ, Yao C, Dave JR, Tortella FC. Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22: 1068-79.
130. Block F, Peters M, Nolden-Koch M. Expression of IL-6 in the ischemic penumbra. *Neuroreport.* 2000;11: 963-7.
131. England T, Martin P, Bath PM. Stem cells for enhancing recovery after stroke: a review. *Int J Stroke.* 2009;4: 101-10.
132. Walker PA, Harting MT, Jimenez F, Shah SK, Pati S, Dash PK, Cox CS Jr. Direct intrathecal implantation of mesenchymal stromal cells leads to enhanced neuroprotection via an NFkappaB-mediated increase in interleukin-6 production. *Stem Cells Dev.* 2010;19: 867-76.
133. Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J.* 2009;276: 13-26.
134. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol.* 2006;198: 54-64.
135. Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam SC, Chopp M. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology.* 2002;22: 275-9.
136. Chen Q, Long Y, Yuan X, Zou L, Sun J, Chen S, Perez-Polo JR, Yang K. Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. *J Neurosci Res.* 2005;80: 611-9.
137. Hagg T. From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist.* 2009;15: 20-7.
138. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008;132: 645-60.
139. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 2004;41: 683-6.
140. Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci.* 2007;8: 481-8.
141. Martí-Fàbregas J, Romaguera-Ros M, Gómez-Pinedo U, Martínez-Ramírez S, Jiménez-Xarrié E, Marín R, Martí-Vilalta JL, García-Verdugo JM. Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke. *Neurology.* 2010;74: 357-65.
142. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.* 2002;8: 963-70.
143. Chopp M, Li Y. Treatment of stroke and intracerebral hemorrhage with cellular and pharmacological restorative therapies. *Acta Neurochir Suppl.* 2008;105: 79-83.
144. Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 1993;72: 835-46.
145. Dvorak HF. Discovery of vascular permeability factor (VPF). *Exp Cell Res.* 2006;312: 522-6.
146. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol.* 2000;156: 965-76.

147. Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95: 15809-14.
148. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol*. 1993;264: C995-1002.
149. Wei L, Erinjeri JP, Rovainen CM, Woolsey TA. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke*. 2001;32: 2179-84.
150. Krupinski J, Stroemer P, Slevin M, Marti E, Kumar P, Rubio F. Three-dimensional structure and survival of newly formed blood vessels after focal cerebral ischemia. *Neuroreport*. 2003;14: 1171-6.
151. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004;94: 678-85.
152. Zacharek A, Chen J, Cui X, Li A, Li Y, Roberts C, Feng Y, Gao Q, Chopp M. Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/Flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27: 1684-91.
153. Pavlichenko N, Sokolova I, Vijde S, Shvedova E, Alexandrov G, Krouglyakov P, Fedotova O, Gilerovich EG, Polyntsev DG, Otellin VA. Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. *Brain Res*. 2008;1233: 203-13.
154. Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM, Shiota Y, Narantuya D, Watanabe T, Masuda J, Kobayashi S, Kim SU, Yamaguchi S. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res*. 2010;88: 1017-25.
155. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100: 1249-60.
156. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nihon Med Sch*. 2009;76: 56-66.
157. Wieloch T, Nikolich K. Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol*. 2006;16: 258-64.
158. Nudo RJ. Functional and structural plasticity in motor cortex: implications for stroke recovery. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2003;14(Suppl 1): S57-76.
159. Nudo RJ, Plautz EJ, Frost SB. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle Nerve*. 2001;24: 1000-19.
160. Chopp M, Li Y, Jiang N. Increase in apoptosis and concomitant reduction of ischemic lesion volume and evidence for synaptogenesis after transient focal cerebral ischemia in rat treated with staurosporine. *Brain Res*. 1999;828: 197-201.
161. Dewar D, Underhill SM, Goldberg MP. Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23: 263-74.
162. Shibata M, Hisahara S, Hara H, Yamawaki T, Fukuuchi Y, Yuan J, Okano H, Miura M. Caspases determine the vulnerability of oligodendrocytes in the ischemic brain. *J Clin Invest*. 2000;106: 643-53.

163. Zhang J, Li Y, Zhang ZG, Lu M, Borneman J, Buller B, Savant-Bhonsale S, Elias SB, Chopp M. Bone marrow stromal cells increase oligodendrogenesis after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29: 1166-74.
164. Li Y, Chen J, Zhang CL, Wang L, Lu D, Katakowski M, Gao Q, Shen LH, Zhang J, Lu M, Chopp M. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia.* 2005;49: 407-17.
165. Kang SK, Shin MJ, Jung JS, Kim YG, Kim CH. Autologous adipose tissue-derived stromal cells for treatment of spinal cord injury. *Stem Cells Dev.* 2006;15: 583-94.
166. McKeon RJ, Hoke A, Silver J. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol.* 1995;136: 32-43.
167. Hirokawa N. Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J Cell Biol.* 1982;94: 129-42.
168. Schroeder E, Vogelgesang S, Popa-Wagner A, Kessler C. Neurofilament expression in the rat brain after cerebral infarction: effect of age. *Neurobiol Aging.* 2003;24: 135-45.
169. Ueno Y, Chopp M, Zhang L, Buller B, Liu Z, Lehman NL, Liu XS, Zhang Y, Roberts C, Zhang ZG. Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke.* 2012;43: 2221-8.
170. Liu Z, Li Y, Zhang ZG, Cui X, Cui Y, Lu M, Savant-Bhonsale S, Chopp M. Bone marrow stromal cells enhance inter- and intracortical axonal connections after ischemic stroke in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30: 1288-95.
171. Sulejczak D, Ziemińska E, Czarkowska-Bauch J, Nosecka E, Strzałkowski R, Skup M. Focal photothrombotic lesion of the rat motor cortex increases BDNF levels in motor-sensory cortical areas not accompanied by recovery of forelimb motor skills. *J Neurotrauma.* 2007;24: 1362-77.
172. Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A, Marie C, Garnier P. Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One.* 2009; 4: e8101.
173. Bejot Y, Prigent-Tessier A, Cachia C, Giroud M, Mossiat C, Bertrand N, Garnier P, Marie C. Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochem Int.* 2011;58: 102-11.
174. Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Dore JJ, Corbett D. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke.* 2009;40: 1490-5.
175. Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Fuentes B, Díez-Tejedor E. Allogenic mesenchymal stem cells in experimental ischaemic stroke. Translation to the clinic?. *Stem Cells and Cancer Stem Cells* MA Hayat (ed). 2012;5: 117-27.
176. Fernández-Gutiérrez M, Fuentes B, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Vallejo-Cremades MT, Díez-Tejedor E. Trophic factors and cell therapy to stimulate brain repair after ischemic stroke. *J Cell Mol Med.* 2012;16: 2280-90.

ANEXO

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats.** Gutiérrez- Fernández M, Rodríguez- Frutos B, Álvarez-Grech J, Vallejo-Cremades MT, Expósito-Alcaide M, Merino J, Roda JM, Díez –Tejedor E. Neuroscience 2011; 175:394-405.

- **Trophic factors and cell therapy to stimulate brain repair after ischaemic stroke.** Gutiérrez- Fernández M, Fuentes B, Rodríguez- Frutos B, Ramos- Cejudo J, Vallejo- Cremades MT, Díez–Tejedor E. Journal Cellular and Molecular Medicine 2012; 16(10):2280-90.

- **Allogenic mesenchymal stem cells in experimental ischaemic stroke. Translation to the clinic?.** Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Fuentes B, Díez-Tejedor E. In: Stem Cells and Cancer Stem Cells. M.A. Hayat (ed.), 2012. Volume 5, Part 3; Pag: 117-127. ISBN-10: 9400728999 | ISBN-13: 978-9400728998 DOI: 10.1007/978-94-007-2900-1_12.

- **Effects of i.v. administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke.** Gutiérrez- Fernández M[†], Rodríguez- Frutos B[†], Ramos- Cejudo J, Vallejo-Cremades MT, Fuentes B, Cerdán S, Díez -Tejedor E. (†igual contribución). Stem Cell Research & Therapy 2013; 4(1):11.